

Aus dem Pathologischen Institut
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Professor Dr. med. V. Becker)

Histochemische Untersuchungen der sauren Mucopolysaccharide unter besonderer Berücksichtigung der Neuraminsäure an Pankreas sowie Magen- und Duodenalschleimhaut

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Peter Albrecht Fülle
aus Stuttgart

Aus dem Pathologischen Institut
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Professor Dr. med. V. Becker)

Histochemische Untersuchungen
der sauren Mucopolysaccharide
unter besonderer Berücksichtigung der
Neuraminsäure an Pankreas sowie
Magen- und Duodenalschleimhaut

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

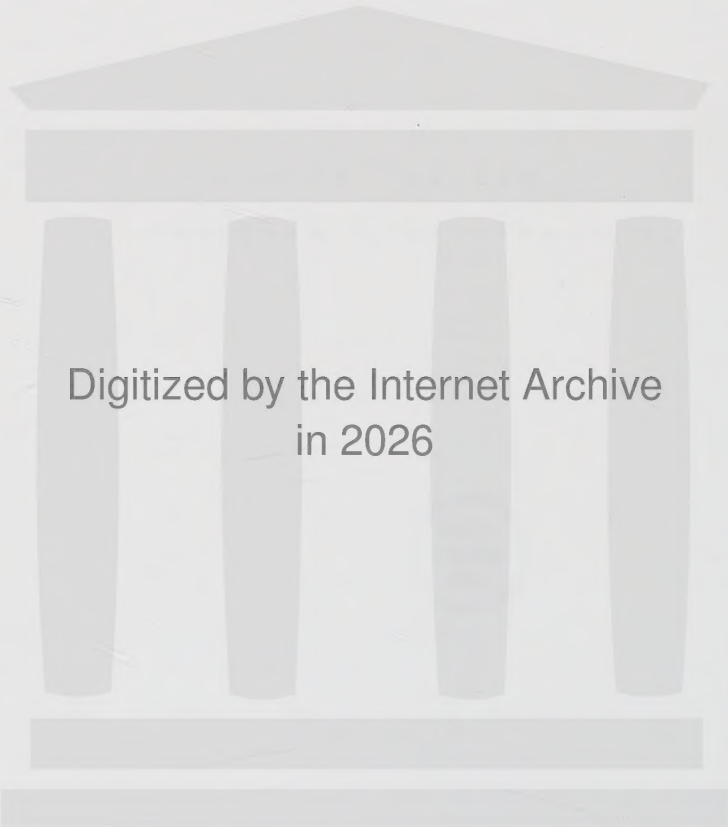
vorgelegt von
Peter Albrecht Fülle
aus Stuttgart

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Professor Dr. med. E. Rügheimer
Referent: Professor Dr. med. V. Becker
Tag der mündlichen Prüfung: 03. Mai 1976

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546220_0079

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
I. Einleitung	3
II. Material und Methoden	4
III. Kurze Anmerkungen zur Anatomie und Histologie	9
IV. Ergebnisse	
A. Ergebnisse der histochemischen Reaktionen an Organen der Ratte	
1. Alcianblau-Färbung	11
2. PAS-Alcianblau-Färbung	14
3. Eisenbindungsreaktion in der Modifikation nach MÜLLER (1955)	19
4. Eisenbindungsreaktion in der Modifikation nach GRAUMANN und CLAUSS (1958)	20
5. Darstellung von Sialinsäuren nach DIEZEL (1957)	27
B. Ergebnisse der Färbeversuche an menschlichen Pankreaten	
1. Kindliches Pankreas (Tod nach Verbrühung).....	28
2. Pankreas bei Lupus Erythematoses visceralis (SN 292/74)	30
3. Pankreas bei Mucoviszidose (SN 464/58, 719/59)	32
C. Ergebnisse der intravitalen Schleimbeeinflussung	
1. <u>Gruppe I:</u> Laparotomie und mechanische Alteration des Pankreas.....	33
2. <u>Gruppe II:</u> Ligatur des Ductus pancreaticus..	34
3. <u>Gruppe III:</u>	
a. Injektion von Natriumazetatpuffer in das Pankreas.....	36
b. Instillation von Natriumazetatpuffer in den Ductus pancreaticus	37
4. <u>Gruppe IV:</u>	
a. Injektion von Neuraminidase-Lösungen in den Pankreaskopf	39
b. Instillation von Neuraminidase-Lösungen in den Ductus pancreaticus	39
c. Instillation von Neuraminidase-Lösungen in den Ductus pancreaticus mit anschließender Gangligatur	41

V. Diskussion

Einführung in die Problematik	42
Drüsenepithel und Schleimsubstanzen	42
Die Sialinsäuren	
Chemie - Vorkommen - Bedeutung	44
Histochemische Nachweismethoden für Mucopolysaccharide	
PAS-Reaktion	48
Alcianblau-Reaktion	50
PAS-Alcianblau-Reaktion	50
Eisenbindungsreaktion	50
Histochemie der Sialinsäure	52
Besprechung der eigenen Ergebnisse	
a. Einfluß der Fixierung	57
b. Mucopolysaccharide in Geweben der Ratte	58
c. Menschliches Pankreas (Kleinkind, Unfalltod)	65
d. Menschliches Pankreas bei Lupus Erythematodes visceralis	66
e. Menschliches Pankreas bei Mukoviszidose	67
f. Intraduktiläre Instillation von Puffer- und Enzym- lösungen	68
VI. Zusammenfassung	69
VII. Literaturverzeichnis	71
VIII. Abbildungen	78

I. E I N L E I T U N G

Die protektive Wirkung des Magenschleimes gegenüber der Entstehung eines Ulcus ventriculi ist seit längerem bekannt.

DOMSCHKE et al.(1972) wiesen nach, daß der Gehalt an Sialinsäuren im Magenschleim bei Ulcusträgern gegenüber Kontrollpersonen signifikant erniedrigt ist, um nach Therapie mit Abheilung des Ulcus wieder auf normale Werte anzusteigen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwieweit Mucopolysaccharide, insbesondere sialinsäurehaltige, auch im Pankreassgang der weißen Ratte eine Schutzfunktion vor Autodigestion ausüben.

Dazu wurden die Pankreaten weißer Ratten verschiedenen histologischen und histochemischen Reaktionen unterworfen und die Ergebnisse mit denen verglichen, die aus der Untersuchung von Magen- und Duodenalschleimhaut gewonnen wurden. Weiter wurde untersucht, welche Folgen sich aus der intravitalen Instillation von Neuraminidase in den Ductus pancreaticus im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ergeben.

Schließlich erfolgte eine vergleichende Untersuchung einiger menschlicher Pankreaten, bei einem Pankreasgesunden (Unfalltod), bei Lupus Erythematodes visceralis sowie bei Mukoviszidose.

II. MATERIAL und METHODEN

Sämtliche Tierversuche wurden mit männlichen weißen Ratten aus einem Inzuchtstamm durchgeführt.

Vor und während der Versuche hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser und standardisierter Nahrung.

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Genickschlag, die Pankreaten wurden danach sofort entnommen und in Chromalaun-Formol-Sublimat oder BOUIN'schem Gemisch fixiert.

Fixierung mit Gemisch nach BOUIN (1857)

Enthält	15 Teile	gesättigte, wässrige Pikrinsäure (ca. 2,0 g Pikrinsäure / 100 ml)
	5 Teile	37%iges Formol
	1 Teil	96%iges Essigsäure

Einzelne Lösungen erst unmittelbar vor Gebrauch zusammengeben.
pH der fertigen Lösung: 2,1 (ARNOLD, 1968).

Entnommenes Gewebe für 24 Std. bei 4°C in Gemisch nach BOUIN geben, anschließend mehrfach in 80%igem Äthanol über 48 Std. spülen, danach fließende Wässerung und Weiterbehandlung.

Chromalaun-Formol-Sublimat - Fixierung nach ELFTMAN (1957)

Enthält	5% Chromalaun
	5% Formalin
	5% Quecksilberchlorid

Zunächst wird eine Stammlösung von 5%igem HgCl_2 hergestellt.
Unmittelbar vor Gebrauch zu 95 ml der Stammlösung 5 ml Formalin und 5 g Chromalaun geben.

Das Gewebe bei Raumtemperatur für etwa 24 Std. in das Gemisch geben, anschließend wässern und übliche Weiterverarbeitung.

Außerdem wurde den Ratten Magen, Duodenum, eine Niere und die Leber entnommen und in gleicher Weise fixiert.

Die menschlichen Pankreaten wurden bei der Sektion entnommen und in BOUIN'schem Gemisch oder Chromalaun-Formol-Sublimat fixiert.
Die Mukoviszidose-Präparate stammen aus in Formol fixiertem Material.

Ein Teil der entparaffinierten Schnitte (Schnittdicke 6 μm) wurde vor der Färbung folgenden Vorbehandlungen unterworfen:

- Überschichten mit 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0, bei 70°C für 1 Std.
- Überschichtung Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, bei 70°C für 1 Std.
- Überschichtung mit Michaelispuffer, pH 9,2, bei 70°C für 1 Std.

- d) Überschichten mit 0,9%iger NaCl-Lösung bei 70°C für 1 Std.
- e) Überschichten mit 0,1 M HCl bei 70°C für 1 Std.
- f) Überschichten mit 1,0 M HCl bei 70°C für 1 Std.
- g) Überschichten mit Neuraminidase-Lösung bei 37°C für 24 Std. in der feuchten Kammer.
- h) Überschichten mit 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0, bei 37°C für 24 Std. in der feuchten Kammer.

Herstellung des 0,1 N Natriumazetatpuffers, pH 5,0

0,1 N Natriumazetat-Lösung (= 0,8205 g Natriumazetat p.a. mit Aqua bidest. auf 100,0 ml auffüllen) vorgeben.
Mit 0,1 N Essigsäure (= 0,625 ml 96%ige Essigsäure p.a. mit Aqua bidest. auf 100,0 ml auffüllen) auf pH 5,0 unter Verwendung eines pH-Meter einstellen.
Dabei kommen ca. 67,8 Teile der Natriumazetat-Lösung auf 32,2 Teile der 0,1 N Essigsäure.

Herstellung der Neuraminidase-Lösung

Verwendet wurden die Neuraminidase-Präparationen der

- a) Firma Boehringer Neuraminidase aus
Clostridium perfringens
1 mg Enzym = 0,6 U
- b) Sigma Chemical Company Neuraminidase Typ VI
aus Clostridium perfringens
1 mg Enzym = 0,78 U

Die Angaben der Aktivität beziehen sich auf die spezifische Aktivität gegenüber Muzin bei 37°C.

Vom Enzym der Firma Boehringer wurden drei Lösungen angesetzt:

- 1) 1 mg Enzym in 5 ml 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0, entsprechend 0,12 U / ml Lösung.
- 2) 2 mg Enzym in 6 ml 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0, entsprechend 0,2 U / ml Lösung.
- 3) 1 mg Enzym in 6 ml 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0, entsprechend 0,1 U / ml Lösung.

Von der Neuraminidase der Sigma Chemical Company wurden ebenfalls drei Lösungen in 0,1 N Natriumazetatpuffer hergestellt:

- 1) 1 mg Enzym in 4 ml Puffer = 0,195 U / ml Lösung
- 2) 1 mg Enzym in 5 ml Puffer = 0,156 U / ml Lösung
- 3) 1 mg Enzym in 6 ml Puffer = 0,130 U / ml Lösung

Inkubation der Schnitte mit Neuraminidase

- 1) Schnitt entparaffinieren, absteigende Alkoholreihe
- 2) Mehrfaches Spülen in aqua bidest.
- 3) Überschichten mit ca. 1 ml der Neuraminidase-Lösung
(Verwendet wurde der Ansatz der Neuraminidase der Firma Boehringer, 1mg Enzym in 6 ml 0,1 N Natriumazetatpuffer, entsprechend 0,1 U / ml Lösung)
- 4) Inkubation für 24 Std. bei 37°C in der feuchten Kammer
- 5) Gründliches Spülen mit Aqua dest.
- 6) Übliche Weiterbehandlung.

Versuche zur intravitalen Schleimbeeinflussung

20 Ratten wurden in Äthernarkose 0,4 bis maximal 1,4 ml einer Lösung von Neuraminidase in 0,1 N Natriumazetatpuffer in den Pankreasgang instilliert. Die Enzymkonzentrationen betrugen dabei 0,12 U, 0,13 U, 0,156 U, 0,195 U sowie 0,20 U pro ml Lösung.

Bei einer Ratte wurde der Ductus pancreaticus nach Instillation der Enzymlösung an der Papille ligiert, bei zwei weiteren erfolgte die Ligierung ohne vorherige Instillation.

3 Ratten wurden 0,5 bis 1,4 ml 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0, in den Pankreasgang instilliert, bei 4 Ratten ca. 0,3 bis 0,5 ml Puffer direkt ins Pankreasgewebe injiziert.

Zwei Ratten wurden lediglich laparotomiert und das Pankreaskopfgebiet mit Duodenum zwischen den Fingern komprimiert, um den Anteil mechanischer Alteration sichtbar zu machen.

Operatives Vorgehen

Die Ratten wurden mit Äther narkotisiert, mit der Schere grob enthaart und in der Linea alba möglichst steril laparotomiert.

Gemäß dem von HEINKEL (1953) angegebenen Verfahren wurde nach Eröffnung der Bauchhöhle das bei der Ratte mobile Duodenum vorverlagert und der Verlauf des Ductus pancreaticus mit dessen Einmündung in das Duodenum aufgesucht. Bei Gegenlichteinfall bereitet es keine großen Schwierigkeiten, den rund 1mm dicken Gang im zarten Mesenterium zu finden und gegenüber der Papille in Verlängerung der Verlaufsrichtung des Ganges mit einer Kanüle Nr. 16 transmural in den Darm einzugehen, um transduodenal den Ductus pancreaticus zu sondieren.

Zur technischen Vereinfachung wurde dabei die Nadel mit einem Gummischlauch (Fahrradventilgummi) von ca. 4 cm Länge armiert, der eine bewegliche Verbindung zu einer Tuberkulinspritze herstellte.

Nach Sondierung des Pankreasganges erfolgte die Instillation der jeweiligen Flüssigkeit. Dabei wurde gleichzeitig an der Leberpforte der Ductus choledochus mit einer feinen, gebogenen Pinzette gefaßt und verschlossen, um einen Abfluß in die Leber zu verhindern.

Die Instillation erfolgte ohne Druck. Beim ersten spürbaren Widerstand wurde die Füllung abgebrochen. Nach Entfernung der Nadel wurde der Pankreasgang an der Papille für etwa 30 sec. komprimiert, um den Abfluß zu hemmen, dann das Duodenum rückverlagert und das Abdomen zweischichtig verschlossen. Die bei drei Ratten durchgeführte Ligierung des Pankreasganges erfolgte unmittelbar an der Papille, die direkte Injektion in das Pankreas erfolgte in den Kopfbereich. Nach der Operation kamen die Ratten in ihre Käfige mit freiem Zugang zu Nahrung und Wasser zurück, die Tötung erfolgte nach einem vorher festgelegten Zeitplan mittels Genickschlag.

Die Gewebeschnitte aus den Pankreaten von Mensch und Ratte sowie aus den übrigen Organen der Ratte wurden - teils direkt, teils nach den aufgezählten Vorbehandlungen - nach folgenden Methoden gefärbt:

1) Hämatoxylin-Eosin (HE) - Übersichtsfärbung (ROMEIS, § 697)

2) Alcianblau-Färbung nach GOMORI (1954) mit Alcianblau - 8 G

- 1) Schnitte in Xylol entparaffinieren, absteigende Alkoholreihe;
- 2) Spülen in Aqua dest.;
- 3) 20 Min. bei Zimmertemperatur in Alcianblau-8 G;
(zu 100 ml Aqua dest. 5 g Kalium-Aluminiumsulfat und 0,5 g Alcianblau - 8 G geben)
- 4) Spülen in Aqua dest.;
- 5) Eventuell Gegenfärbung mit Kernechtrot;
- 6) Aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, Einbettung.

3) PAS-Alcian-Färbung nach MOWRY (1956)

- 1) Entparaffinieren in Xylol, absteigende Alkoholreihe;
- 2) 30 Min. Alcianblau - 8 GS - Lösung;
(0,1 g Alcianblau in 97 ml Aqua dest. lösen und drei ml Eisessig zugeben)
- 3) Spülen mit Aqua dest., kurz in 1%ige Phosphormolybdänsäure geben;
- 4) 30 Min. in 5%ige Perjodsäure;
- 5) Spülen in 70%igem Alkohol;
- 6) 30 Min. in Schiff's Reagens;

- 7) 3 x 5 Min. Spülen in Spülflüssigkeit;
(10 ml 10%ige Natriumbisulfit-Lösung in 200 ml Aqua dest. geben und 10 ml 1 N HCl zufügen)
 - 8) 15 Min. fließend wässern;
 - 9) Aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, Einbetten.
- 4) Eisenbindungsreaktion nach HALE (1946), modifiziert nach MÜLLER (1955) mit und ohne Kernechtrot-Gegenfärbung.
- 1) Entparaffinieren in Xylol, absteigende Alkoholreihe;
 - 2) Spülen in Aqua dest.;
 - 3) Für 10 Min. bei Zimmertemperatur in kolloidale Lösung aus 10 Teilen Ferrihydroxyl-Sol (750 ml Aqua dest. aufkochen und 12 ml einer 32%igen FeCl_3 -Lösung zugeben) und 1 Teil Eisessig;
 - 4) 5 x 1 Min. Aqua dest.;
 - 5) 10 Min. in frisch angesetzte Lösung von 1 g Kaliumferrocyanid in 100 ml 1%iger HCl geben;
 - 6) Spülen in Aqua dest., eventuell Gegenfärbung mit Kernechtrot;
 - 7) Aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, Einbetten.
- 5) Eisenbindungsreaktion in der Modifikation nach GRAUMANN und CLAUSS (1958), mit und ohne Kernechtrot - Gegenfärbung
- 1) Schnitt in Xylol entparaffinieren, absteigende Alkoholreihe;
 - 2) Spülen in Aqua dest.;
 - 3) Bei Zimmertemperatur für 10 Min. in kolloidale Lösung aus 10 Teilen Ferrihydroxyl-Sol (750 ml Aqua dest. aufkochen und 12 ml einer 32%igen FeCl_3 -Lösung zugeben) und 4 Teilen Eisessig geben;
 - 4) 2 x 5 Min. in 5%iger Essigsäure spülen;
 - 5) Berlinerblau-Reaktion nach PERLS (1869)
 - a. Spülen in Aqua dest.
 - b. Schnitte für 20 Min. bei Zimmertemperatur in frische Lösung aus 90 ml 1%iger HCl und 10 ml 2%iges Kaliumhexacyanoferrat (II) geben;
 - c. in Aqua dest. spülen;
 - 6) Eventuell mit Kernechtrot gegenfärben;
 - 7) Aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, Einbetten.
- 6) Methode nach DIEZEL (1957) zum Nachweis der Neuraminsäure
- 1) Entparaffinieren in Xylol, absteigende Alkoholreihe;
 - 2) Lufttrocknen;
 - 3) 1 Std. in Aceton bei 60°C;
 - 4) 1 Std. in Äther;
 - 5) Trockenen Schnitt mit BIAL'schem Reagens (40,7 ml konz. HCl, 0,1 g Orcin, 1 ml 1%ige FeCl_3 -Lösung) besprühen, bis Schnitt gleichmäßig feucht ist. Überflüssiges Reagens abtropfen lassen oder abtupfen;
 - 6) In einem gut verschließbaren, vorgewärmten Glasbehälter, in dem sich etwa 20 ml konz. HCl befinden, Objektträger mit Schnitt nach unten ca. 30 cm über Gefäßboden so einhängen, daß Salzsäuredämpfe gut an das Gewebe herankommen. Für 1/4 bis 1/2 Std. bei 85°C inkubieren.
 - 7) Danach Schnitte aus HCl - Dämpfen nehmen, vorsichtig und schnell abtupfen, in Xylol geben und danach einbetten.

III. KURZE ANMERKUNGEN ZUR ANATOMIE UND HISTOLOGIE

Im Gegensatz zum kompakten, retroperitoneal gelegenen menschlichen Pankreas ist das der Ratte ein dendritisches, verästeltes Organ im dorsalen Mesenterium von Magen und Duodenum. Bei der Sektion entfernt man es am besten en bloc mit Magen, Zwölffingerdarm und Milz, um Materialverlust zu vermeiden. Nach der Fixierung gelingt die Isolierung des Pankreas wesentlich müheloser.

Zentroazinäre Zellen fehlen dem Pankreas der Ratte (WANKE, 1968), sein Gehalt an Schleim ist im Vergleich mit Pankreaten anderer Versuchstiere relativ gering (BADE, 1972).

Der Ductus pancreaticus der Ratte besitzt bis zur Einmündung in das Duodenum ein einschichtiges Epithel, größere Ausführungsgänge im menschlichen Pankreas weisen hingegen Inseln mehrschichtigen Epithels auf (BARGMANN, 1967).

Bezüglich der weiteren Anatomie und Histologie der untersuchten Organe sei auf die einschlägigen Lehrbücher verwiesen.

IV.

ERGEBNISSE

Die Schilderung der Ergebnisse der Färbungen und histochemischen Reaktionen ist wie folgt gegliedert:

A. Ergebnisse der histochemischen Reaktionen an Organen der Ratte

- 1) Alcianblau - Färbung
- 2) PAS - Alcianblau - Färbung
- 3) Eisenbindungsreaktion in der Modifikation nach MÜLLER (1955)
- 4) Eisenbindungsreaktion in der Modifikation nach GRAUMANN und CLAUS (1958)
- 5) Darstellung von Sialinsäuren nach DIEZEL (1957)

B. Ergebnisse der Färbeversuche an menschlichen Pankreaten

- 1) Kindliches Pankreas (Tod an Verbrennung)
- 2) Pankreas bei Lupus Erythematodes visceralis, SN 292/74
- 3) Pankreas bei Mukoviszidose, SN 464/58 und 719/59

C. Ergebnisse der intravitalen Schleimbeeinflussung

- Gruppe I: Laparotomie und mechanische Alteration des Pankreas
- Gruppe II: Ligatur des Ductus pancreaticus
- Gruppe III: a. Injektion von 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0,
in das Pankreas
b. Instillation von 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0,
in den Ductus pancreaticus
- Gruppe IV: a. Injektion von Neuraminidase-Lösung in das Pankreas
b. Instillation von Neuraminidase-Lösung in den
Ductus pancreaticus
c. Instillation von Neuraminidase-Lösung in den Pan-
kreasgang mit anschließender Ligierung an der Papille.

5 Ratten verendeten in der ersten Nacht postoperativ - 2 nach Instillation von Neuraminidase in den Pankreasgang, eine nach Injektion der Enzym-Lösung in das Pankreas, je eine nach Pufferinstillation und - Injektion. Die Pankreaten dieser Tiere wurden nicht verwertet, um autolytische Einflüsse auszuschalten.

Die überlebenden Ratten wurden nach 24, 48, 72 oder 96 Std. getötet und die entnommenen Organe wie oben aufgeführt behandelt.

A. Ergebnisse der histochemischen Reaktionen an Organen der Ratte

1) Färbung mit Alcianblau - 8 G nach GOMORI (1954)

a. Fixierung mit BOUIN'schem Gemisch

Pankreas:

Das Epithel des Ductus pancreaticus wird durch Alcianblau nicht gefärbt. Es weist hingegen einen kräftig türkisblauen, körnigen Belag auf dem freien Rand auf, welcher im papillennahen Bereich, in buchtigen Ausweitungen des Hauptganges und in den im Bindegewebsmantel des Hauptganges liegenden Begleitgängen besonders kräftig ausgebildet ist.

Stellenweise finden sich im hochzylindrischen Gangepithel im apikalen Bereich türkisblaue, zum Lumen hin sich verdichtende Granula.

In den kleinen, peripheren Ausführungsgängen mit kubischem Epithel ist der blaue Belag nicht oder nur spärlich nachweisbar.

Die Azinusepithelien selbst erscheinen ungefärbt. Dagegen lassen sich feine, blau-grünliche Strukturen darstellen, die die Azini reifartig umgeben und morphologisch als Basalmembranen anzusehen sind.

Das Inselepithel wird mit Alcianblau nicht gefärbt, Unterschiede zwischen A- und B-Zellen lassen sich nicht feststellen. Dagegen reagieren die Endothelien der zwischen den Zellbalken liegenden Kapillaren.

Bindegewebe: Die feinen interazinären Bindegewebsfasern stellen sich schwach bläulich dar. In gleicher Weise reagiert das gesamte retikuläre Binde- und Fettgewebe des Mesenterium. Unter der Serosa ist es verdichtet und stärker blau gefärbt. Die dichten, bindegewebigen Hüllen der größeren Gefäße und Ausführungsgänge geben ebenfalls eine stärkere, blaue Reaktion. Im Bindegewebe liegende, rundliche Zellen mit tiefblauem Zytoplasma und bohnenförmigen Kern sind als Mastzellen aufzufassen.

Duodenum:

Im Duodenum kommt es zu einer starken, leuchtend türkisblauen Anfärbung des Schleimes der Becherzellen. Die Darmepithelien selbst sind nicht gefärbt. Ebenso wenig läßt sich der Kutikularsaum der Darmepithelien durch Alcianblau darstellen. Die äußere Kontur des Saumes erscheint nur insofern leuchtend blau, als er mit Schleim der Becherzellen überzogen ist.

Die Basalmembran des Darmepithels ist schwach blau dargestellt, das Bindegewebe des Zottenstromas nur angedeutet grünlich-blau getönt.

Epithel und Schleim der Brunner'schen Duodenaldrüsen bleiben völlig ungefärbt.

Eine leichte Reaktion mit Alcianblau erfolgt am Bindegewebe der Submucosa, deren faserige Strukturen sich grünlich-blau darstellen.

Die Muscularis bleibt ungefärbt, wohingegen sich die subseröse Bindegewebslamelle blau darstellt. Das Mesethel selber reagiert inkonstant.

Gefäße:

Das Endothel der Gefäße reagiert inkonstant, regelmäßig und deutlich gefärbt erscheint die subendotheliale Intimalamelle. Die Elastica der Arterien wird durch Alcianblau nicht gefärbt, erscheint aber - vor allem von der Intima her - deutlich konturiert. Die Media bleibt bis auf vereinzelte faserige Strukturen ungefärbt, kräftig reagiert das Bindegewebe der Adventitia.

Die Blutbestandteile bleiben ungefärbt

b. Fixierung in Chromalaun-Formol-Sublimat

Pankreas:

Die Anfärbbarkeit des in Chromalaun-Formol-Sublimat fixierten Gewebes erscheint gegenüber der Fixierung in BOUIN'schem Gemisch stark herabgesetzt.

Das Pankreasparenchym ist ungefärbt, in den im Gewebeschnitt randständigen Partien reagieren die Zellkerne ganz schwach blau-grünlich. Der apikale Saum des papillennahen Ductus pancreaticus ist mit einem dünnen, weitgehend konstant nachweisbaren, blauen Belag überzogen. In einigen Gangepithelien ist der lumenwärtige Zytoplasmabereich verwaschen bläulich gefärbt.

An den peripheren Gängen findet keine Alcianblaufärbung statt, die Azini sind gleichfalls völlig ungefärbt.

Bindegewebe: Das interazinäre Bindegewebe und die Basalmembranen reagieren nicht, vereinzelt kommt es zu einer sehr schwachen, grünlich-blauen Anfärbung der submesothelialen Bindegewebslamelle.

Das kollagene Bindegewebe um große Speichelgänge und Gefäße wird ebenfalls nur schwach grünlich gefärbt. Wo das Bindegewebe zu groben Fasern aufgesplittert ist, stellen sich diese stärker blau dar.

Duodenum: Der Schleim der Becherzellen sowie der Schleimbelag der Darmepithelien stellen sich türkisblau dar. Die Epithelien selber und ihr Kutikularsaum, die Basalmembranen, das Zottenstroma und die Duodenaldrüsen mit deren Sekret sind völlig ungefärbt. Die Submucosa ist hauchartig grünlich getönt.

Magenschleimhaut: Das Epithel der Schleimhautoberfläche und der Foveolae gastricae ist hauchartig grünlich getönt. Im oberen, an die Foveolae angrenzenden Teil der Drüsenschläuche stellen sich Zellen dar, deren apikaler Zytoplasmabereich intensiv türkisblau reagiert. Der basale Bereich der Drüsenschläuche reagiert nicht, die Submucosa ist schwach grünlich tingiert.

Pylorusschleimhaut: Das Epithel der basal gelegenen Anteile der Drüsenschläuche reagiert im apikalen Zytoplasmaabschnitt kräftig türkisblau. Sonst erfolgt keine Reaktion mit Alcianblau.

2) PAS - Alcianblau - Färbung nach MOWRY (1956)

a. Fixierung mit BOUIN'schem Gemisch

Pankreas: Das Epithel des proximalen Ductus pancreaticus ist lumenwärts mit einem dünnen, bläulich-violetten Belag überzogen. Das Epithel der kleineren, im Bindegewebsmantel des Hauptganges liegenden Ausführungsgänge ist im apikalen Anteil bläulich- bis rötlich-violett granuliert. Das Epithel der kleinen peripheren Gänge und der Azini ist ungefärbt.

Bindegewebe: Das kollagene Bindegewebe um die großen Pankreasgänge und um die Gefäße ist schwach rötlich-violett gefärbt. Das lockere und retikuläre interazinäre und mesenteriale Binde- und Fettgewebe zeigt eine gerade sichtbare, violette Färbung, die im Bereich der verdichteten submesothelialen Bindegewebslamelle stärker ausfällt.

Duodenum: Der Schleim der Becherzellen erscheint bläulich-violett, die die Darmepithelien überziehende Schleimschicht stellt sich eine Spur mehr rötlich-violett dar. Das Epithel der BRUNNER'schen Duodenaldrüsen ist ganz schwach rötlich gefärbt.

b. Fixierung mit Chromalaun-Formol-Sublimat

Schon makroskopisch ergibt sich ein anderer Aspekt als bei den mit BOUIN'schem Gemisch fixierten Schnitten: Während diese bei Betrachtung mit bloßem Auge blaß ocker bis rötlich gefärbt erscheinen, fällt die Reaktion nach Fixierung in Chromalaun-Formol-Sublimat wesentlich stärker aus, so daß die Schnitte kräftig blau-rötlich erscheinen.

Pankreas:

Das Epithel des proximalen Ductus pancreaticus weist einen weitgehend konstant vorhandenen, dunkelblau-violetten apikalen Saum auf, der in den in der Bindegewebshülle des Hauptgangs verlaufenden kleineren Gängen stärker ausgeprägt ist. Der lumenwärtige Zytoplasmabereich ist vielfach rötlich- bis blau-violett granuliert.

Das Epithel der kleinen peripheren Ausführungsgänge zeigt keine derartige apikale Reaktion.

Die Azinusepithelien erscheinen trüb bläulich-rot gekörnt, in den Randbezirken der Gewebeschnitte, die der stärksten Fixiermittelwirkung ausgesetzt waren, erscheinen die Kerne und das basale Zytoplasma vielfach leicht türkisblau getönt. Ansonsten ist der Zymogenbereich der Azinusepithelien stärker rötlich-blau granuliert als die basalen Abschnitte.

Die Basalmembranen der Azini reagieren nur schwach mit einer teils rot-, teils bläulichvioletten Anfärbung. Die Basalmembranen der lobulus-peripheren Azini erscheinen bisweilen sogar türkisblau.

Das Inselepipithel reagiert bei der PAS-Alcianblau-Färbung nicht oder nur ganz unspezifisch, die Kapillaren zwischen den Inselepipithel-Balken stellen sich rötlich-violett dar.

Durch vorherige Übersichtung der Gewebeschnitte mit 0,9%iger NaCl-Lösung, 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0, sowie Michaelis-Puffer, pH 9,2, für 1 Stunde bei 70°C wird der Ausfall der PAS-Alcianblau-Reaktion nicht beeinflusst.

Nach Inkubation der Schnitte in mit Natriumazetat auf pH 2,5 eingestellter Essigsäure bei 70°C fällt eine Abschwächung bis Fehlen der Alcianblaukomponente bei der Darstellung der Schleimsubstanzen im Ductus pancreaticus auf: Der beschriebene blau-violette Farbton des Schleimbelages der Gangepithelien ist einer rotvioletten bis purpurfarbenen Reaktion gewichen.

Pankreas:

Nach einstündiger Exposition zu Natriumazetat/
Essigsäure, pH 2,5, bei 70°C fällt in einer Reihe
von Präparaten die PAS-Reaktion kräftiger aus als
ohne Vorbehandlung: Die Azinusepithelien erscheinen
rötlich, vielfach ist die Reaktion in der Zone der
Zymogengranula betont. Auch die PAS-Reaktion der
Basalmembranen der Azini wird kräftiger.

Bindegewebe:

Das lockere, interazinäre Bindegewebe erscheint teils
rötlich- teils bläulich-violett. Stellenweise reagieren
die feinen Bindegewebsfasern leicht türkisblau.
Die Wandung der kapillären Gänge zwischen den Azini,
eine Unterscheidung in Kapillaren, Lymphbahnen oder
feinste Sekretgänge ist nicht zu treffen, stellt sich
gleichfalls teils mehr bläulich- teils mehr rötlich-
violett dar. In der Peripherie des Gewebeschnittes
überwiegt der bläuliche Farbton.

Das die größeren Ausführungsgänge und Gefäße umgebende
Bindegewebe ist überwiegend rotviolett, in gröbere
Fasern aufgesplittertes Bindegewebe stellt sich türkis-
blau dar.

Durch einstündige Inkubation in Natriumazetat/Essig-
säure, pH 2,5, bei 70°C fehlt diese türkisblaue An-
färbung der Bindegewebsfasern. Auch die bei nicht vor-
behandelten Schnitten zu beobachtende Alcianblau-Reak-
tion am interazinären Bindegewebe fehlt.

Die mit 0,9%iger NaCl-Lösung, 0,1 N Natriumazetat-
puffer, pH 5,0, oder Michaelis-Puffer, pH 9,2, inku-
bierten Schnitte zeigen ein gleiches Verhalten des
Bindegewebes gegenüber der PAS-Alcianblau-Reaktion
wie die unbehandelten Schnitte.

Duodenum:

Der Schleim der Becherzellen färbt sich tief dunkel-
blau-violett an, sowohl innerhalb der Becherzellen
als auch als Belag des Darmepithels.

Duodenum:

Im apikalen Zytoplasma der Darmepithelien stellen sich feine, rötlich-violette Granula dar. Der Kutikularsaum ist nicht gefärbt, ihm liegt aber eine konstant vorhandene, kräftige rotviolette Schicht auf, die stellenweise vom blau gefärbtem Schleim der Becherzellen überlagert ist. Die Basalmembran der Darmepithelien ist schwach rötlich dargestellt, im sonst reaktionslosen Zottenstroma liegen vereinzelt Zellen mit rötlich-violetten Granula.

Die Muscularis mucosae ist schwach rötlich dargestellt. Die Submucosa zeigt eine nur sehr schwache PAS-Reaktion und eine gerade noch merkbare türkisblaue Anfärbung. Das Epithel der BRUNNER'schen Duodenaldrüsen erscheint im apikalen Abschnitt dicht und kräftig, im basalen Zytoplasmabereich fein rötlich-violett mit Überwiegen des Rottones granuliert.

Durch Vorbehandlung mit Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, in der angegebenen Weise kommt es nicht zu der beschriebenen dunkelblau-violetten, sondern zu einer tief purpurfarbenen, allein auf die PAS-Reaktion zu beziehenden Anfärbung des Schleimes der Becherzellen. Die ohne Vorbehandlung an der Submucosa stattfindende, schwache Alcianblau-Färbung fehlt.

Dagegen erscheint nach Exposition zu pH 2,5 die PAS-Reaktion an Basalmembranen und Bindegewebe, besonders aber an Schleim und Epithel der Duodenaldrüsen, verstärkt.

Die Inkubation in 0,9%iger NaCl-Lösung, 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0, oder Michaelis-Puffer, pH 9,2, führt zu k e i n e r Veränderung im Ausfall der PAS-Alcianreaktion gegenüber den nicht vorbehandelten Präparaten.

Magenschleimhaut:

Die Epithelien der Foveolae gastricae zeigen in ihrem apikalen Anteil eine starke, rotviolette PAS-Reaktion, das Lumen der Magengrübchen ist von rotvioletten

Magenschleimhaut:

Schollen erfüllt. Das die Schleimhautoberfläche bedeckende Epithel enthält ebenfalls in großer Zahl PAS-positive Granula und ist von einer kräftigen, rotvioletten Schicht bedeckt.

Die Epithelzellen der oberen Bereiche der eigentlichen Drüenschläuche, kurz vor deren Einmündung in die Foveolae, weisen tief dunkelblaue bis blauviolette Granula auf.

Besonders im mittleren Drittel der Drüenschläuche findet sich eine größere Zahl rundlicher, sich teils in das Drüenschlauchlumen vorwölbender Zellen, die blaß rötlich bis rötlich-violett gefärbt sind. Der überwiegende Teil der Epithelzellen der Drüenschläuche zeigt keine Reaktion auf PAS-Alcianblau.

Basalmembranen und Bindegewebe verhalten sich wie in den oben beschriebenen Organen.

Der Ausfall der PAS-Alcianblau-Reaktion an der in Chromalaun-Formol-Sublimat fixierten Magenschleimhaut der Ratte wird durch einstündige Inkubation der Schnitte vor der Färbung in 0,9%iger NaCl-Lösung, 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0, und Michaelis-Puffer, pH 9,2, nicht verändert.

Eine einstündige Inkubation in Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, bei 70°C führt hingegen zu einer starken bis vollständigen Abnahme der Alciankomponente bei der Färbung der Epithelien der obersten Anteile der Drüenschläuche. Infolge der verbleibenden, starken PAS-Reaktion sind diese Zellen und ihre Sekrete nicht mehr von den Epithelien der Foveolae gastricae zu unterscheiden.

Pylorusschleimhaut:

Die Schleimhaut der Übergangszone Magen-Duodenum zeigt eine starke PAS-Reaktion im apikalen Abschnitt der Epithelien, sowohl an der Oberfläche der Schleimhaut, als auch in den tieferen Abschnitten der Drüenschläuche. In den basalsten Abschnitten der

Pylorusschleimhaut: Drüsen-schläuche, dicht oberhalb der Muscularis muco-sae, schlägt der rotviolette Farbton der schollen-artigen Granula in einen reinen Blauton um. Zwischen den Epithelien mit den rotvioletteten Granula und den basalen mit den blauen Granula liegt eine kurze Strecke ungefärbten Epithels, stellenweise gehen die beiden, durch das färberische Verhalten ihrer Schleime unterschiedenen Epitheltypen ineinander über.

Nach einstündiger Exposition der Schnitte zu Natriumazetatpuffer/Essigsäure, pH 2,5, bei 70°C ist die Alcianblau-Färbung der basalen Epithelien nicht mehr nachweisbar.

Statt dessen findet sich eine schwache, wabige PAS-Reaktion. Die gleiche PAS-Reaktion ergibt auch die alleinige PAS-Färbung ohne Vorbehandlung. Bei der kombinierten PAS-Alcianblau-Färbung wird die schwache PAS-Komponente vom Alcianblau bei den nicht zu pH 2,5 exponierten Schnitten völlig verdeckt.

Durch Inkubation der Schnitte in 0,9%iger NaCl-Lösung oder 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0, bei 70°C für 1 Stunde wird der Ausfall der PAS-Alcian-Reaktion gegenüber den nicht vorbehandelten Schnitten nicht beeinflusst.

3) Eisenbindungsreaktion, modifiziert nach MÜLLER (1955)

Die Eisenbindungsreaktion in der Modifikation nach MÜLLER (1955) wurde mit in Chromalaun-Formol-Sublimat fixierten Rattenpankreaten vorgenommen. Es resultierte eine Eisenanlagerung an nahezu alle Strukturen des Gewebes. Am stärksten reagierten die Becherzellen des Duodenum und deren Schleim, gefolgt von den Epithelien der Langerhans'schen Inseln, der Intima der Gefäße und dem Bindegewebe.

Die Azinusepithelien stellten sich homogen blau-grün dar, die Basalmembranen reagieren stark.

Auch die Verwendung von 1%iger Eissigsäure anstelle des Aqua destillata zur Spülung nach der Einwirkung des kolloidalen Eisens brachte keinen nennenswerten Effekt: Es gab nur sehr wenig im Gewebe, was nicht mit dem kolloidalen Eisen darzustellen war.

Wegen der hochgradigen Unspezifität der Methode wurde darauf verzichtet, sie in größerem Umfang zu benutzen.

4) Eisenbindungsreaktion, modifiziert nach GRAUMANN und CLAUSS (1958)

a. Fixierung mit BOUIN'schem Gemisch

Pankreas:

Die Azinusepithelien weisen eine schwache, grünliche Färbung auf. Die Kerne liegen als völlig reaktionslose, helle Kugeln im basalen Zytoplasma.

Die Basalmembranen und das interazinäre Bindegewebe zeigen keine Eisenanlagerung.

Dafür sind die das spalt- oder sternförmige Lumen der Azini begrenzenden Epithelsäume intensiv blau dargestellt.

Das Epithel des proximalen Ductus pancreaticus ist in seinem lumenwärtigen Anteil von tiefblauen Granula erfüllt, die sich stellenweise zu einem kräftig blauen Belag auf dem freien Rand des Gangepithels verdichten. Der basale Anteil der hochprismatischen Epithelzellen des Hauptganges zeigt keine Eisenanlagerung. Die im Bindegewebsmantel des Hauptganges liegenden kleineren Gänge mit kubischem Epithel weisen einen sehr konstant vorhandenen Belag mit kräftiger Eisenbindung und dichte, tiefblaue Granula im apikalen Zytoplasmabereich der Epithelzellen auf.

Die kleinen Gänge in der Peripherie zeigen bis auf fragmentarisch anzutreffende, blaue Beläge auf dem freien Rand des Epithels keine Eisenanlagerung. Das Inselepithel zeigt eine schwächere Eisenbindung als die Azinusepithelien. Eine Unterscheidung von A- oder B-Zellen ist nicht möglich.

Pankreas: Eine verwaschene, schwache Eisenbindung erfolgt an den freien Rändern der von den Inselepithelien gebildeten Zellbalken. Eine Zuordnung zu einer bestimmten Struktur ist unsicher.

Bindegewebe: Das lockere und retikuläre Binde- und Fettgewebe des Mesenterium zeigt eine nur schwache und sehr inkonstante Eisenanlagerung. Eine stärkere und regelmäßigere Eisenbindung erfolgt am Mesothel und an der submesothelialen Bindegewebslamelle. Gelegentlich stellt sich das kollagene Bindegewebe um einen größeren Pankreasgang oder um Gefäße schwach blau dar.

Duodenum: Der Schleim der Becherzellen gibt eine sehr kräftige Eisenbindungsreaktion. Eine geringe Reaktion gibt das Bindegewebe der Submucosa, ansonsten wird an den Strukturen des in BOUVIN'schem Gemisch fixierten Duodenum kein Eisen gebunden. Insbesondere lassen sich die Duodenaldrüsen und deren Schleim mit der Eisenbindungsreaktion in der Modifikation nach GRAUMANN und CLAUSS (1958) nicht darstellen.

b. Fixierung mit Chromalaun-Formol-Sublimat

Pankreas: Die Azinusepithelien zeigen eine geringe, diffuse Eisenanlagerung, der Zymogenbereich ist gerade noch sichtbar blau-grünlich granuliert. An intakten, strukturell gut erhaltenen Lobuli findet sich die bereits beschriebene Eisenbindungsreaktion an der freien Oberfläche der das Azinusbalken begrenzenden Epithelien. Die Basalmembranen der Azini und das interazinäre Bindegewebe zeigen eine mehr oder weniger kräftige Eisenanlagerung.

Pankreas:

Die im interazinären Bindegewebe verlaufenden, feinen Gänge fallen durch eine tiefblaue Darstellung ihrer Wandungen auf, die als dünne, blaue Linien oder ringförmige Konturen dargestellt werden. Eine Einteilung dieser kapillären Gänge in echte Kapillaren, Lymphgefäße oder feinste Sekretkapillaren ist nur vereinzelt möglich.

Der Ductus pancreaticus im Kopfbereich der Bauchspeicheldrüse, nahe seiner Einmündung in das Duodenum, besitzt auf dem freien Rand seines hochprismatischen Epithels einen kräftigen Belag, der eine starke Eisenbindungsreaktion gibt. Im apikalen Zellpol der Epithelien finden sich feine, bläulich-grüne Granula.

Eine noch stärkere Eisenanlagerung zeigen die Epithelien und der Schleimbelag der kleinen, im mächtigen Bindegewebsmantel des Hauptganges liegenden Begleitgänge.

Auch die kleinsten peripheren, innerhalb und zwischen den Lobuli gelegenen Ausführungsgänge mit flachkubischem Epithel weisen - zumindest in strukturell gut erhaltenen Präparaten - einen dünnen Schleimbelag mit deutlicher Eisenanlagerung auf.

Die Inseln heben sich durch eine im Vergleich mit den Azini stärkere, diffus bläuliche Anfärbung der Epithelzellen aus dem übrigen Drüsenverband hervor.

Eine Differenzierung verschiedener Zelltypen ist durch den Ausfall der Eisenbindungsreaktion nicht möglich. Die scharfe, tiefblaue Randkontur der Inselepipithelien zu den erythrozytenhaltigen "Maschen" des von ihnen gebildeten Netzes ist auf eine Eisenanlagerung an die Kapillarendothelien oder deren Basalmembran zurückzuführen.

Eine Inkubation der Schnitte in 0,9%iger NaCl-Lösung oder Natriumazetatpuffer, pH 5,0, hat auf den Ausfall der Eisenbindungsreaktion in der Modifikation nach

Pankreas:

GRAUMANN und CLAUSS (1958) nur eine Auswirkung:
Es kommt zu einer Abschwächung der Eisenanlagerung an den basalen Zellpol der Azinusepithelien, wodurch in einer Reihe von Präparaten die Zymogengranula selektiv dargestellt werden. Die Eisenbindung an Granula und Schleimbelag der Gangepithelien wird n i c h t beeinflusst.

Hingegen ist nach einstündiger Inkubation der Schnitte in Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, bei 70°C die Eisenanlagerung an die Azinusepithelien, auch an die Zymogengranula, stark abgeschwächt bis aufgehoben. Auch die Basalmembranen binden kein Eisen mehr. Keine Veränderung erfährt die Eisenanlagerung an Granula und Schleimbelag der Gangepithelien. Deutlich vermindert ist dagegen die Eisenbindungsreaktion der Inselepithelien.

Die einstündige Inkubation der Schnitte in 0,1 M und 1,0 M HCl führt zu einer noch stärkeren Verminderung der nachfolgenden Eisenbindungsreaktion: Die Eisenanlagerung an Azinus- und Inselepithelien ist vollständig unterdrückt, der Schnitt wirkt wie ungefärbt. Lediglich der Schleimbelag und die Granula der Epithelien des Hauptganges binden noch kolloidales Eisen, so daß eine selektive Darstellung dieser Strukturen erzielt wird. Gegenüber den nicht vorbehandelten Schnitten ist nach Exposition zu 0,1 M und 1,0 M jedoch auch die Eisenanlagerung an die Schleimsubstanzen des Ductus pancreaticus vermindert.

Durch eine 24-stündige Inkubation der sorgfältig entparaffinierten Schnitte bei 37°C in 0,9%iger NaCl-Lösung oder 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0, wird der Ausfall der Eisenbindungsreaktion nicht beeinflusst.

Dagegen hatte die 24-stündige Inkubation bei 37°C mit einer Lösung von 1 mg Neuraminidase in 6 ml 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0, entsprechend 0,1 U/ml Lösung,

Pankreas: folgende Auswirkungen auf den Ausfall der Eisenbindungsreaktion:

Im Gegensatz zu den unbehandelten oder in Puffer inkubierten Schnitten fehlt vor allem die blaugrünliche Darstellung der Zymogengranula, so daß der apikale Zellpol blasser erscheint als die basalen Bezirke der Azinusepithelien. Die Eisenanlagerung an die Basalmembranen der Azini ist vermindert bis aufgehoben, an den Wandungen der kapillären Gänge zwischen den Azini jedoch unverändert, so daß bei verminderter Eisenbindung an das interazinäre Bindegewebe der Verlauf und die große Anzahl dieser Strukturen erst jetzt richtig deutlich werden.

Die Eisenbindung an die apikalen Epithelsäume, die das Azinulumen begrenzen, ist überwiegend erhalten, wodurch das Azinulumen körnig konturiert erscheint. Die Eisenanlagerung an das Epithel der Langerhans'schen Inseln ist deutlich bis stark herabgesetzt.

Bindegewebe: Die nicht vorbehandelten Schnitte zeigen eine deutliche Eisenanlagerung an das interazinäre Bindegewebe und an das retikuläre mesenteriale Binde- und Fettgewebe mit verstärkter Reaktion der submesothelialen Lamelle. Das kollagene Bindegewebe um die großen Ausführungsgänge und Gefäße zeigt eine kräftige blaugrüne Anfärbung. Nach einstündiger Inkubation der Schnitte in 0,9%iger NaCl-Lösung, Natriumazetatpuffer, pH 5,0, oder Michaelis-Puffer, pH 9,2, bei 70°C ergibt sich keine Änderung im Ausfall der Eisenbindungsreaktion.

Nach einstündiger Inkubation in Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, 0,1 N oder 1,0 N HCl bei 70°C zeigen das interazinäre Bindegewebe und das Fett- und Bindegewebe des Mesenterium keine Eisenanlagerung mehr. Ganz vereinzelt reagiert noch das kollagene Bindegewe-

webe um Gänge und Gefäße. Die vereinzelt Eisenbindungsreaktion sind nach Inkubation mit 0,1 oder 1,0 N HCl noch seltener als nach Vorbehandlung mit Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5.

Durch eine 24-stündige Inkubation der Schnitte bei 37°C in Natriumazetatpuffer, pH 5,0, ließ sich die Eisenbindungsreaktion nur in dem Maße beeinflussen wie durch einstündige Überschichtung mit dem gleichen Puffer bei 70°C.

Nach 24-stündiger Inkubation mit einer Lösung von 0,167 mg Neuraminidase pro ml 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0, entsprechend 0,1 U Enzym/ml Lösung, bei 37°C ist die Eisenanlagerung an das interazinäre Bindegewebe, an das mesenteriale Binde- und Fettgewebe sowie an das kollagene Bindegewebe um Gänge und Gefäße deutlich herabgesetzt bis ganz aufgehoben.

Duodenum:

Bei den nicht vorbehandelten Schnitten findet sich eine maximal starke Eisenbindungsreaktion am Schleim der Becherzellen, die Epithelien samt Kutikularsaum reagieren nicht.

Die BRUNNER'schen Duodenaldrüsen binden kein Eisen, durch Kernechtrot-Gegenfärbung wird ihr Epithel schwach rötlich angefärbt.

Die Basalmembranen zeigen eine schwache Eisenanlagerung. Ganz gering wird kolloidales Eisen auch durch das lockere Bindegewebe der Submucosa und durch die bindegewebige Lamelle zwischen Muscularis interna und externa gebunden.

Inkubation für 1 Stunde bei 70°C in Natriumazetatpuffer, pH 5,0, 0,9%iger NaCl-Lösung und Michaelis-Puffer, pH 9,2, führt zu keiner Änderung der Eisenbindungsreaktion.

Nach einstündiger Vorbehandlung mit Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, fehlt die Eisenanlagerung an das Bindegewebe. Der Schleim der Becherzellen reagiert unvermindert stark.

In einigen Präparaten zeigen die Epithelien der Duodenaldrüsen nach Exposition zu pH 2,5 eine ganz schwache, hauchartige Eisenanlagerung.

Die Inkubation mit 0,1 M und 1,0 M HCl für 1 Stunde bei 70°C führt zu gleichen Ergebnissen wie die Überschlachtung mit Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5.

Während die 24-stündige Inkubation mit Natriumazetatpuffer, pH 5,0, bei 37°C zu keiner Änderung der Eisenanlagerung führt, fällt nach Inkubation mit Neuraminidaselösung in der beschriebenen Weise eine Abschwächung der Eisenbindung an die bindegewebigen Strukturen der Submucosa auf.

Die Eisenanlagerung an den Schleim der Becherzellen wird durch Neuraminidase nicht beeinflusst.

Magenschleimhaut: An nicht vorbehandelten Schnitten zeigt das Oberflächenepithel der Magenschleimhaut und das der Foveolae gastricae im apikalen Zytoplasmabereich eine kräftige Eisenbindungsreaktion in Form von Granula, die zum freien Epithelsaum hin dichter und zahlreicher werden. Eine noch stärkere Eisenanlagerung erfolgt an Granula in den Epithelzellen der oberen Anteile der Drüsen-schläuche, unmittelbar vor deren Einmündung in die Foveolae.

Im mittleren und unteren Abschnitt der Drüsen-schläuche finden sich eine Anzahl großer, rundlicher Zellen, deren Zytoplasma staubfein bläulich granuliert erscheint. Die Basalmembranen der Drüsenepithelien und die bindegewebigen Septen der Interstitien werden bläulich dargestellt.

Diese Verhältnisse lassen sich durch einstündige Inkubation bei 70°C mit 0,9%iger NaCl-Lösung oder Natriumazetatpuffer, pH 5,0, nicht verändern.

Magenschleimhaut: Nach Vorbehandlung mit Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, bleibt die Eisenanlagerung an die Epithelien der Magenschleimhautoberfläche, der Magengrübchen und des oberflächlichen Anteils der DrüsenSchläuche erhalten. In den tiefen Anteilen der DrüsenSchläuche ist keine Eisenbindung mehr nachweisbar.

Die Exposition der Schnitte für 1 Stunde bei 70°C zu 0,1 N oder 1,0 N HCl führt zu einer weitgehenden Unterdrückung der Eisenanlagerung; es reagieren lediglich die Epithelien der obersten Anteile der DrüsenSchläuche, ansonsten verhält sich die Mucosa negativ.

Pylorusschleimhaut: Die Epithelien der basal gelegenen Anteile der DrüsenSchläuche zeigen eine kräftige Eisenanlagerung im apikalen Zytoplasmabereich. Die oberflächlichen Anteile der DrüsenSchläuche geben nur eine ganz schwache Eisenbindungsreaktion der Epithelzellen.

Das gleiche Ergebnis erhält man nach Inkubation der Schnitte mit 0,9%iger NaCl-Lösung, Natriumazetatpuffer, pH 5,0, oder Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5. Auch eine 24-stündige Inkubation bei 37°C mit Natriumazetatpuffer, pH 5,0, oder Neuraminidase-Lösung, 0,1 U/ml 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0, führt zu keiner Änderung der Eisenbindungsreaktion.

5) Darstellung von Neuraminsäure nach DIEZEL (1957)

Das von DIEZEL (1957) beschriebene Verfahren zur histochemischen Darstellung der Neuraminsäure erwies sich bei der vorliegenden Untersuchung als ungeeignet. Durch die konzentrierten Salzsäuredämpfe wurden fast alle Gewebeschnitte vernichtet. Die wenigen Präparate, die nicht völlig zerstört wurden, zeigten eine schwache, fleckige bis diffuse rötliche Anfärbung, die nicht auf bestimmte Strukturen bezogen werden konnte. Verwertbar waren die Ergebnisse in keinem Fall.

B. Ergebnisse der Färbeversuche an menschlichen Pankreaten

1) Kindliches Pankreas nach Tod an Verbrühung

Fixierung mit BOUIN'schem Gemisch

Die Eisenbindungsreaktion in der Modifikation nach GRAUMANN und CLAUSS (1958) zeigt folgende Ergebnisse: Bei der Übersichtsvergrößerung fällt eine vom Rand des Schnittes in Richtung Zentrum zunehmende Eisenbindung auf.

An der Peripherie gelegene, der Fixiermittelwirkung besonders exponierte Azini lassen im basalen Bereich der Azinusepithelien jegliche Eisenanlagerung vermissen. Im Zymogenbereich wird hingegen Eisen angelagert, diese Zone dadurch selektiv dargestellt.

In den zentral gelegenen Partien des Schnittes wird diese selektive Darstellung der Zymogenzone durch eine zunehmende diffuse Eisenbindung auch an den basalen Bezirken der Azinusepithelien verdeckt. Durch Gegenfärbung mit Kernechtrot, wodurch vor allem die basalen Epithelabschnitte der Azini angefärbt werden, kommt die selektive Eisenbindungsreaktion des Zymogengranula-Bereichs auch in den zentralen Partien des Schnittes wieder zum Vorschein.

Das interazinäre Bindegewebe lagert in den zentralen Bezirken des Schnittes Eisen an, in den peripheren nicht. Das interlobuläre Bindegewebe und das Bindegewebe um Gänge und Gefäße zeigt eine deutliche Eisenbindung.

Der apikale Zytoplasmaabschnitt der Epithelzellen der Ausführungsgänge gibt eine positive Eisenbindungsreaktion, die freie Epitheloberfläche erscheint kräftig dunkelblau konturiert.

Nach 1-stündiger Inkubation der Schnitte in Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, und 0,1 N HCl bei 70°C ist die Eisenbindungsreaktion vollständig unterdrückt. Lediglich der freie Saum des Gangepithels zeigt einige punktuelle Reaktionsorte!

Fixierung mit Chromalaun-Formol-Sublimat

Nach Fixierung in Chromalaun-Formol-Sublimat ergibt die Eisenbindungsreaktion ein anderes Bild als nach Fixierung mit BOUIN'schem

Gemisch. Bei der Fixierung nach ELFTMAN (1957) binden gerade die basalen Zytoplasmabezirke der Azinusepithelien in den peripheren Bereichen der Schnitte kolloidal gelöste Eisen, wodurch sich die Zymogenzone hell grüngelblich abhebt. Die Kerne sind nicht dargestellt.

Zum Zentrum der Schnitte hin nimmt die Färbung der basalen Azinusbezirke ab, bis in Umkehrung des Bildes schließlich die Zymogenzone - wenn auch nur angedeutet - eine stärkere Eisenbindung aufweist.

Bei der PAS-Alcianblau-Färbung geben die Azinusepithelien in der Zone der Zymogengranula eine feinkörnige, kräftige PAS-Reaktion. Die basalen Abschnitte der Azinusepithelien geben lediglich eine schwache, diffuse Reaktion, in manchen Präparaten sind sie völlig blaß.

Die Basalmembranen der Azini geben eine deutliche Eisenbindungsreaktion, ebenso das interazinäre Bindegewebe und die Kapillaren. Bei der PAS-Alcianblau-Färbung stellen sich Basalmembranen und interazinäres Bindegewebe mit Kapillaren rotviolett dar.

Das Epithel der Ausführungsgänge zeigt im apikalen Zytoplasmabereich an Zahl und Größe in Richtung Lumen zunehmende Granula, die sich bei der Eisenbindungsreaktion (Modifikation nach GRAUMANN und CLAUSS, 1958) tiefblau, bei der PAS-Alcianblau-Färbung dunkelblauviolett darstellen. Der freie Saum der Gangepithelien ist von einer blauen (Eisenbindungsreaktion) beziehungsweise blauvioletten (PAS-Alcianblau-Färbung) Schleimschicht belegt.

Durch 1-stündige Inkubation der Schnitte bei 70°C in 0,9%iger NaCl-Lösung oder Michaelispuffer, pH 9,2, läßt sich der Ausfall der PAS-Alcianblau-Färbung und der Eisenbindungsreaktion (in der Modifikation nach GRAUMANN und CLAUSS, 1958) nicht beeinflussen.

Eine Inkubation mit Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, führt bei der PAS-Alcianblau-Färbung zu einem Verlust der Alcianblau-Komponente bei der Reaktion der Granula und des Schleimbelages der Gangepithelien, so daß sich diese nun tief rotviolett darstellen.

Die Exposition zu pH 2,5 vor der Eisenbindungsreaktion verhindert bei einigen Schnitten die Eisenanlagerung an die Zymogengranula der Azinusepithelien, bei anderen ist sie lediglich geringfügig herabgesetzt. Die Eisenbindung an das interazinäre Bindegewebe wird vermindert, auf die Anlagerung kolloidalen Eisens an Granula und Schleimbelag der Gangepithelien hat die Vorbehandlung mit Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, keinen Einfluß.

Durch 1-stündige Inkubation bei 70°C in 0,1 oder 1,0 N HCl wird die nachfolgende Eisenbindungsreaktion weitgehend unterdrückt; lediglich der apikale Schleimbelag der Gangepithelien stellt sich tiefblau dar, alle anderen Strukturen sind reaktionslos.

Eine 24-stündige Inkubation der Schnitte bei 37°C in Natriumazetat-puffer, pH 5,0 führt ebensowenig zu einer sicheren Beeinflussung der Eisenbindungsreaktion wie die Inkubation mit einer Neuraminidase-Lösung unter den beschriebenen Bedingungen.

2) Pankreas bei Lupus Erythematodes visceralis (SN 292/74)

Die dicht gelagerten Azini zeigen eine PAS-positive Granulierung des Zytoplasmas, welche den basalen Bereich der Azinusepithelien ausläßt und nach apikal zunimmt, um in der Zymogenzone ihr Maximum zu erreichen.

Die Eisenbindungsreaktion (GRAUMANN und CLAUSS, 1958) führt zu einer diffus grünlichen Färbung der Azinusepithelien, wobei die Eisenanlagerung in der Peripherie des Schnittes stärker ausfällt.

Die Basalmembranen und das interazinäre Bindegewebe stellen sich bei der PAS-Alcianblau-Färbung rotviolett, bei der Eisenbindungsreaktion blau-grünlich dar.

Das Epithel der zahlreichen Ausführungsgänge weist im Zytoplasma der zylindrischen Zellen relativ grobe Granula auf, die zum Lumen hin an Zahl zunehmen und teils einen kräftigen Belag auf dem freien Epithelsaum geben. Granula und Belag reagieren bei der PAS-Alcianblau-Färbung tiefblau-violett, bei der Eisenbindungsreaktion zeigen sie eine starke Eisenanlagerung.

Das Lumen größerer Gänge ist von kugelig-wabigen Massen erfüllt, deren Querschnitte sich bei der Eisenbindungsreaktion blaßblau, die Begrenzungen scharf konturiert dunkelblau darstellen.

Mit der Eisenbindungsreaktion lassen sich die beschriebenen, tiefblauen Granula auch in den Epithelien der kleinen und kleinsten Gänge innerhalb der Lobuli nachweisen.

Die Epithelien der Langerhans'schen Inseln erscheinen bei der PAS-Alcianblau-Reaktion ganz schwach und fein rötlich-violett granuliert, bei der Eisenbindungsreaktion zeigen sie eine ebenso schwache Blaufärbung. Die Kapillaren zwischen den Inselepipithelzellen geben eine kräftige PAS-Reaktion und binden Eisen.

Eine 1-stündige Inkubation der Gewebeschnitte in Natriumazetatpuffer, pH 5,0, Michaelispuffer, pH 9,2, oder 0,9%iger NaCl-Lösung bei 70°C bleibt ohne Einfluß auf eine nachfolgende PAS-Alcianblau-Färbung. Hingegen wird die Eisenanlagerung an die basalen Zellpole der Azinus-epithelien herabgesetzt, wodurch die Zone der Zymogengranula selektiv zur Darstellung kommt. Weiter wird die Eisenbindungsreaktion nicht beeinflusst.

Vorbehandlung mit Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, für 1 Stunde bei 70°C führt bei der PAS-Alcianblau-Färbung zu einem Farbumschlag der vom Gangepithel sezernierten Schleims-substanzen von tiefblau-violett nach rotviolett. Ansonsten keine Veränderung.

Der Ausfall der Eisenbindungsreaktion wird durch Inkubation in Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, stärker verändert: Die Azinus-epithelien zeigen eine völlig negative Eisenbindungsreaktion, das interazinäre Bindegewebe lagert nur ganz vereinzelt Eisen an. Unverändert stark ist die Reaktion des Schleimes der Gangepithelien. Nach Exposition der Schnitte zu 1,0 N HCl bei 70°C für 1 Stunde findet eine Eisenanlagerung nur noch an den Granula in den Gangepithelien und am Schleimbelag statt, dort allerdings unvermindert stark.

Nach 24 Stunden Inkubation mit Natriumazetatpuffer, pH 5,0, bei 37°C findet sich eine verringerte Eisenanlagerung an die basalen Zytoplasmabereiche der Azinusepithelien, wodurch die Reaktion der Zymogengranula-Zone betont erscheint. Ansonsten keine Veränderung Eisenbindungsreaktion.

Durch Einwirkung von Neuraminidase in der oben beschriebenen Weise

kommt es stellenweise zu einer Unterdrückung oder zumindest Abschwächung der Eisenbindung an das interazinäre Bindegewebe, Basalmembranen und Zymogengranula. Die Eisenbindung an den Schleimbelag und Granula der Gangepithelien wird nicht beeinflusst.

3) Pankreas bei Mukoviszidose (SN 719/59, 464/58)

Die hier beschriebenen Gewebeschnitte stammen aus in Formol fixiertem Material.

SN 464/58

Im Vordergrund steht eine starke Vermehrung kollagenen Bindegewebes, welches von der bindegewebigen Umhüllung der Ausführungsgänge aus fingerförmig zwischen die Lobuli vordringt und die Azini umfaßt.

Die Feinstruktur der Azini ist vielfach zerschlagen, der Drüsenverband in Einzelzellen oder ungeordnete Haufen von Azinuszellen aufgelöst, die von kernreichem Bindegewebe um- und überwachsen werden. Das Organ erscheint zirrhotisch umgewandelt.

Die Epithelien der noch erhaltenen und der zerschlagenen Azini binden kein Eisen mehr. Das Bindegewebe zeigt eine positive Eisenbindungsreaktion.

Das kubische Epithel der kleineren und das hochzylindrische Epithel der größeren Ausführungsgänge weisen im apikalen Zellpol blaue Granula auf, die auf dem freien Rand der Epithelien einen durch Eisenanlagerung tiefblau gekörnten Belag bilden.

Im Ganglumen finden sich tiefblaue, körnige Massen.

Nach 1-stündiger Inkubation in Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, ist die Eisenanlagerung an das gewucherte interazinäre Bindegewebe unterdrückt, an das kollagene Bindegewebe um Gänge und Gefäße gering vermindert.

Die Schleimssubstanzen der Ausführungsgänge reagieren unvermindert stark.

Nach Exposition zu 0,1 N HCl bei 70°C für 1 Stunde binden nur noch die Schleimssubstanzen der Gangepithelien kolloidales Eisen, und zwar unvermindert stark. Das restliche Pankreasparenchym samt Bindegewebe verhält sich völlig negativ.

SN 719/59

Die normale Pankreasstruktur ist nur noch in Grobform vorhanden: Die Lobuli enthalten keine intakten Azini mehr; die Epithelien sind teils völlig ausgewalzt, teils großvakuolig umgewandelt.

Die Azini sind an vielen Stellen mit einem fädigen Material erfüllt, welches teils intrazellulär in den Azinusepithelien, teils im ausgeweiteten Lumen anzutreffen ist und eine sehr starke Eisenbindungsreaktion gibt. Vor allem die Lobulus-Peripherie ist von diesen Veränderungen betroffen.

Im Zentrum der Lobuli liegen inmitten großer Mengen lockeren Bindegewebes innerhalb der bindegewebigen Ausgußform ehemaliger Azini teils ungeordnete Haufen, infolge schwacher Eisenbindung blaßblauer Zellen, die ein zentrales Lumen ausbilden, teils bereits fertige tubuläre Gebilde mit ein- bis zweireihigem Epithel und körniger Eisenanlagerung an den freien Epithelsäumen.

Bei der PAS-Alcianblau-Färbung sind die Azinusepithelien blaß rötlich-violett, die oben beschriebenen, in den Azini liegenden fädigen Massen tiefblau bis blauviolett gefärbt; die Basalmembranen geben eine starke PAS-Reaktion.

Die Epithelien der Pankreasgänge weisen von basal nach apikal sich verdichtende, PAS-positive Granula auf. In einigen Gängen färbt sich die oberste Schicht dieser Granula zunehmend blau, es kommt zu einem Überwiegen der Alcianblau-Komponente. Im Lumen der Gänge liegen fädige, dichte Massen, die durch die PAS-Alcianblau-Färbung tief blau dargestellt werden und bei der Eisenbindungsreaktion sehr viel Eisen anlagern.

Nach einstündiger Einwirkung von 0,1 N HCl bei 70°C ergibt sich bei der nachfolgenden PAS-Alcianreaktion eine leichte Abschwächung der Alciananfärbbarkeit der fädigen Massen innerhalb der Azini und Gänge. Ansonsten keine Veränderungen.

C. Ergebnisse der intravitalen Schleimbeeinflussung

Gruppe I: Laparotomie und mechanische Alteration des Pankreas

Nach 24 Stunden findet sich ein feinkörniges, in der HE-Färbung rötliches Ödem, welches das retikuläre Gewebe des

Gruppe I: Mesenterium überflutet und die Drüsenläppchen auseinander gedrängt hat. Die Lobuli selbst sind unversehrt, die Gänge intakt.

In den Ödembezirken sind die Lymphbahnen erweitert und mit einem feinkörnigen, in der HE-Färbung rötlichen Material erfüllt, welches vom Ödem nicht zu unterscheiden ist.

Versehentlich eingebrachte, aus der Bauchhaut des Tieres stammende Haare haben nach 24 Stunden zur Bildung entzündlicher Infiltrate mit massenhaften Ansammlungen von segmentkernigen Leukozyten und Rundzellen (Makrophagen) geführt. Im Bereich dieser Infiltrate finden sich Nekrosen des mesenterialen Fettgewebes und Fibrinausfällungen.

Bei der Eisenbindungsreaktion (GRAUMANN und CLAUSS, 1958) läßt sich keine Eisenanlagerung an die Ödemflüssigkeit nachweisen, durch Gegenfärbung mit Kernechtrot färbt sie sich schwach rötlich.

Die PAS-Alcianblau-Färbung führt zu einer gerade noch erkennbaren trüb rötlich-violetten Reaktion des körnigen Ödems.

Gruppe II: Ligatur des Ductus pancreaticus

a. 24 Stunden Überlebenszeit

Im retikulären Binde- und Fettgewebe des Pankreaskopfes finden sich um den enorm dilatierten Ductus pancreaticus ausgedehnte Hämorrhagien und Nekrosefelder, die von segmentkernigen Leukozyten und Makrophagen überlagert sind. Ganze Lobuli sind im Kopfbereich nekrotisiert und zu körnig-eosinen Massen umgewandelt, vor allem in den lobulus-zentralen Bereichen. Andere Lämpchen zeigen zu tubulären Gebilden ausgewalzte Azini neben solchen, deren Epithelien zu einem ungeordneten Zellhaufen kollabiert erscheinen. Dazwischen finden sich Zellen mit offenbar fibroblastischer und phagozytotischer Aktivität.

Gruppe II: Im distalen Pankreas erscheinen die Folgen der Gangligatur dagegen geringfügig: Innerhalb der Azini beginnende Ausweitung der sonst nicht erkennbaren Lumina zu mehr oder weniger breiten Spalträumen, deutliche Erweiterung der Gänge. Die Blutgefäße sind strotzend gefüllt, in manchen Interlobärsepten befindet sich ein körniges Ödem. Um einzelne Gänge beginnende Ansammlung von Fibroblasten. Die nekrotischen Azinusepithelien im Pankreaskopf geben eine ganz schwache Eisenbindungsreaktion, bei Gegenfärbung mit Kernechtrot stellen sie sich verdämmernd rötlich dar. Sofern sie von segmentkernigen Leukozyten überlagert sind, binden die Basalmembranen kein Eisen. Nekrobiotische, großvakuolig entartete Azini geben eine deutliche Eisenbindungsreaktion an ihren Basalmembranen. Das Epithel des dilatierten Ductus pancreaticus ist im Kopfbereich über weite Strecken nicht mehr hochzylindrisch, sondern flachkubisch. Überall jedoch lassen sich im apikalen Zytoplasma der Epithelzellen stark eisenbindende Granula nachweisen, die auf dem freien Epithelsaum einen dichten Belag bilden. Im wenig alterierten, distalen Pankreas ergibt die Eisenbindungsreaktion in der Modifikation nach GRAUMANN und CLAUSS (1958) die für das Pankreas der Ratte üblichen, oben beschriebenen Ergebnisse. Das stellenweise anzutreffende körnig-fädige Ödem zeigt eine ganz geringe Eisenanlagerung, eine starke Eisenbindung weisen Granula im spindelförmigen Zelleib der Fibroblasten auf. In der Leber finden sich 24 Stunden nach Gangligatur runde, scharf begrenzte Nekroseherde ohne Leukozyteneinwanderung. Die fädigen, nekrotischen Massen geben eine ganz schwache Eisenbindungsreaktion. Die gestauten Gallengänge lagern an den apikalen Epithelsaum reichlich Eisen an.

b. 48 Stunden Überlebenszeit nach Gangligatur

48 Stunden nach Ligatur des Ductus pancreaticus direkt an dessen Einmündung ins Duodenum findet man bei der Übersichtsvergrößerung ein stark alteriertes Pankreas mit röhrenförmig ausgewalzten, stark erweiterten, sägeblattartig geschlängelten Gängen und einer enormen Bindegewebswucherung.

Bei der HE-Übersichtsfärbung fehlt die sonst anzutreffende Basophilie der basalen Zellpole der Azinusepithelien, stark ausgeweitete Azini weisen vereinzelt nekrotische oder nekrobiotische Epithelzellen auf. Zum Teil finden sich in den Epithelien großen Vakuolen.

Das abgeflachte Epithel der ausgeweiteten Gänge zeigt bei der HE-Färbung vereinzelt Kernpyknosen, das Lumen ist von wabigem, rötlichen Material erfüllt.

Die Alcianblau-Färbung (Fixierung des Materials in BOUIN'schem Gemisch) gibt eine kräftige Reaktion der Basalmembranen von Azinus- und Gangepithelien, die im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker erscheint. Ansonsten ergeben sich keine Abweichungen zum Ausfall der Alcianblau-Färbung bei den Pankreaten der Kontrolltiere.

Auch die Eisenbindungsreaktion nach GRAUMANN und CLAUSS (1958) ist nach 48 Stunden weder in Stärke noch Verteilung gegenüber nicht operierten oder lediglich laparotomierten Ratten verändert.

Da sich im Zelleib der zahlreichen Fibroblasten tiefblaue Granula darstellen, wird bei der Eisenbindungsreaktion die starke Bindegewebsneubildung besonders augenfällig.

Gruppe III: a. Injektion von 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0, in das Pankreas

Weder das histologische Bild bei der HE-Färbung, noch der Ausfall der Eisenbindungsreaktion lassen Besonderheiten

erkennen. Auch bei der Alcianblau-Färbung ergibt sich das für in BOUIN'schem Gemisch fixierten Material übliche Bild, wie es oben beschrieben wurde.

Bei einem Tier kam es bei der Laparotomie zu einer vielfachen Einspießung von Haaren aus der Bauchhaut in das retikuläre Binde- und Fettgewebe des Mesenterium. In diesem finden sich nach 96 Stunden Überlebenszeit großflächige entzündliche Infiltrate mit vielen segmentkernigen Leukozyten und Rundzellen unmittelbar um die eingebrachten Haarfragmente und massenhaft Epitheloidzellen.

An einigen Stellen finden sich echte epitheloidzellige Reaktionen mit Riesenzellen vom Fremdkörper-Typ. Das epitheloidzellige Gewebe bindet viel kolloidales Eisen, wobei sich parallel liegende, fasrige Strukturen darstellen, zwischen denen die "schuhsohlenförmigen" Kerne liegen.

b. Instillation von 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0,
in den Ductus pancreaticus

Die Folgen einer Intraduktulären Instillation von Natriumazetatpuffer, pH 5,0, sind abhängig von der Menge der eingebrachten Flüssigkeit

24 Stunden nach Instillation von 0,8 ml Puffer sind große Teile des Pankreas von einem körnigen Ödem überflutet. Die Gefäße sind strotzend gefüllt, die Lymphbahnen dilatiert. Die überwiegende Mehrzahl der Lobuli ist intakt. Stellenweise finden sich - stets in Gangnähe - Nekrosen des retikulären Fettgewebes. Hier treten massenhaft segmentkernige Leukozyten auf, die auch einzelne Azini angreifen.

Ganz vereinzelt sind einzelne Azini oder kleine Azinusgruppen nekrotisiert, wobei diese Ergebnisse stets zentral im Lobulus anzutreffen sind.

Gruppe III: Um manche Gänge, deren aufgesplittertes kollagenes Bindegewebe mit kolloidalem Eisen tiefblau reagiert, liegen eine Vielzahl von segmentkernigen Leukozyten und Rundzellen und auch hämorrhagisches Exudat. Solche Gänge zeigen eine defekte Epithelschicht aus abgeplatteten, teils zerstörten Epithelzellen mit Einrissen und einem vermindertem Schleimbelag.

24 Stunden nach Instillation von 1,0 ml Puffer in den Pankreasgang findet sich im Kopfbereich des Pankreas ein gewaltiges, feinkörniges Ödem. Distales Pankreas ohne wesentliches Ödem. Im Kopfbereich sind großflächige Azinusnekrosen anzutreffen, die zentral in den Lobuli liegen. Die Lobulusperipherie ist weitgehend intakt. Die nekrotisierten Azini stellen sich bei HE-Färbung als körnig-rötliche Massen dar und sind mit Rundzellen überwuchert. Wenig segmentkernige Leukozyten.

Im distalen Pankreas finden sich ebenfalls zentrale Nekrosen, die aber kleinflächiger und seltener sind als im Kopfbereich.

24 Stunden nach Instillation von 1,4 ml Puffer resultiert eine noch weitgehendere Zerstörung des Pankreasgefüges. Die Ödemseen sind noch gewaltiger, die Azinusnekrosen, lobuluszentral gelegen, noch umfangreicher. Vielfach ist das Ödem hämorrhagisch. Wenig segmentkernige Leukozyten, es überwiegen monozytäre Zellen.

Eine Massierung segmentkerniger Leukozyten findet sich in einem Bezirk nekrotisierten Fettgewebes.

72 Stunden nach Instillation von 0,5 ml Puffer ist das Pankreas weitgehend unauffällig, bis auf die bereits beschriebenen entzündlichen Reaktionen durch eingebrachte Haare.

Stellenweise sind die Interlobulärsepten von fädigem, bei HE-Färbung rötlich angefärbtem Material erfüllt, in dem zahlreiche Rundzellen und spindelförmige Fibroblasten liegen. Die Ausführungsgänge sind im Vergleich zu den Kontrollpräparaten weiträumig.

Gruppe III: 96 Stunden nach Instillation von 0,5 ml Puffer zeigen nur noch die erweiterten Gänge, ganz vereinzelte Ödemreste zwischen den Lobuli und entzündliche Infiltrate im retikulären Fettgewebe den vorausgegangenen Eingriff an.

In einem Läppchen-Bezirk finden sich Zeichen für eine Obstruktion der regionalen Ausführungsgänge: Die Azini sind röhrenförmig ausgewalzt, Verlust der eosinophilen Zymogenzone und Abschwächung der basalen Basophilie der Azinusepithelien. Beginnende Bindegewebsvermehrung und Fibrose des betroffenen Gebietes.

Ansonsten sind die Lobuli völlig intakt und geben die übliche Eisenbindungsreaktion und Anfärbung mit PAS-Alcianblau.

Auch in den ausgewalzten Azini binden die apikalen Epithelsäume kolloidales Eisen.

Bemerkenswert ist bei den in BOUIN'schem Gemisch fixierten Schnitten das unterschiedliche Verhalten gegenüber der Eisenbindungsreaktion und der Alcianblau-Färbung: Der Schleimbelag auf dem Epithel des Pankreasganges bindet viel Eisen, färbt sich aber mit Alcianblau nur gering türkisblau an. Dagegen reagiert das kollagene Bindegewebe mit Alcianblau kräftiger als mit kolloidalem Eisen, vor allem in den Randpartien des Schnittes.

Gruppe IV: a. Injektion von Neuraminidase-Lösung in den Pankreaskopf

Die Injektionen von 0,2 ml einer Lösung von Neuraminidase (0,12 bzw. 0,195 U Enzym/ml 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0) zeigen nach 24 und 48 Stunden keine besonderen Folgen. Allenfalls findet sich ein mäßiges interlobuläres Ödem offenbar vaskulärer Genese; die Gefäße in den betroffenen Gebieten sind strotzend gefüllt und erweitert.

b. Instillation von Neuraminidase-Lösungen in den Ductus pancreaticus

24 Stunden nach Instillation von 0,5 und 1,0 ml einer Lösung von Neuraminidase, entsprechend 0,1 und 0,195 U

Gruppe IV: Enzym, ergibt sich folgendes Bild:

Nach Instillation von 0,5 ml Enzymlösung ist der Kopfbereich von einem umfangreichen, hämorrhagischen Ödem erfüllt, im retikulären Fettgewebe des Mesenterium findet man zahlreiche Nekrosen mit massenhaft segmentkernigen Leukozyten.

In mehreren Lobuli, auch in distalen Pankreasbezirken, sind alle Azini zu eosinen, klumpigen Massen nekrotisiert, bei nicht totalem Untergang sind stets die lobulusperipheren Azini verschont.

Von den noch intakten Azinusgebieten dringen segmentkernige Leukozyten in die Nekrosezonen ein.

Das gleiche Bild entsteht durch Instillation von 1 ml der Enzymlösung. Hier finden sich nach 24 Stunden Leukozytenansammlungen auch um einige der erweiterten Ausführungsgänge, deren Epithelbelag stellenweise lückenhaft und rupturiert erscheint. Auch der Hauptgang ist betroffen, in dessen Lumen sich viele segmentkernige Leukozyten befinden.

Auch im Bereich des abgeplatteten, alterierten Epithels ist die Schleimschicht auf den Epithelzellen des Pankreasganges erhalten und bindet unverändert viel kolloidales Eisen. Die PAS-Alcianblau-Färbung führt an der Schleimschicht zu den gleichen Ergebnissen wie nach Instillation von Puffer.

Das Ödem und die nekrotischen Azini zeigen eine geringe Eisenbindung.

Auch bei weiteren Pankreaten zeigt sich 24 Stunden nach Instillation der Enzymlösung ein schweres, hämorrhagisches Ödem des Pankreas mit leukozytenüberwucherten, lobuluszentralen Azinusnekrosen.

48 Stunden nach Instillation von 0,4 bis 1,0 ml einer Neuraminidase-Lösung, entsprechend 0,062 bis 0,195 U Enzym, finden sich Zeichen einer abgelaufenen akuten Entzündung mit Bildung eines Granulationsgewebes, welches an Stelle untergegangener Azini tritt und das die ur-

Gruppe III: 96 Stunden nach Instillation von 0,5 ml Puffer zeigen nur noch die erweiterten Gänge, ganz vereinzelte Ödemreste zwischen den Lobuli und entzündliche Infiltrate im retikulären Fettgewebe den vorausgegangenen Eingriff an.

In einem Läppchen-Bezirk finden sich Zeichen für eine Obstruktion der regionalen Ausführungsgänge: Die Azini sind röhrenförmig ausgewalzt, Verlust der eosinophilen Zymogenzone und Abschwächung der basalen Basophilie der Azinusepithelien. Beginnende Bindegewebsvermehrung und Fibrose des betroffenen Gebietes.

Ansonsten sind die Lobuli völlig intakt und geben die übliche Eisenbindungsreaktion und Anfärbung mit PAS-Alcianblau.

Auch in den ausgewalzten Azini binden die apikalen Epithelsäume kolloidales Eisen.

Bemerkenswert ist bei den in BOUIN'schem Gemisch fixierten Schnitten das unterschiedliche Verhalten gegenüber der Eisenbindungsreaktion und der Alcianblau-Färbung: Der Schleimbelag auf dem Epithel des Pankreasganges bindet viel Eisen, färbt sich aber mit Alcianblau nur gering türkisblau an. Dagegen reagiert das kollagene Bindegewebe mit Alcianblau kräftiger als mit kolloidalem Eisen, vor allem in den Randpartien des Schnittes.

Gruppe IV: a. Injection von Neuraminidase-Lösung in den Pankreaskopf

Die Injektionen von 0,2 ml einer Lösung von Neuraminidase (0,12 bzw. 0,195 U Enzym/ml 0,1 N Natriumazetatpuffer, pH 5,0) zeigen nach 24 und 48 Stunden keine besonderen Folgen. Allenfalls findet sich ein mäßiges interlobuläres Ödem offenbar vaskulärer Genese; die Gefäße in den betroffenen Gebieten sind strotzend gefüllt und erweitert.

b. Instillation von Neuraminidase-Lösungen in den Ductus pancreaticus

24 Stunden nach Instillation von 0,5 und 1,0 ml einer Lösung von Neuraminidase, entsprechend 0,1 und 0,195 U

Gruppe IV: Enzym, ergibt sich folgendes Bild:

Nach Instillation von 0,5 ml Enzymlösung ist der Kopfbereich von einem umfangreichen, hämorrhagischen Ödem erfüllt, im retikulären Fettgewebe des Mesenterium findet man zahlreiche Nekrosen mit massenhaft segmentkernigen Leukozyten.

In mehreren Lobuli, auch in distalen Pankreasbezirken, sind alle Azini zu eosinen, klumpigen Massen nekrotisiert, bei nicht totalem Untergang sind stets die lobulusperipheren Azini verschont.

Von den noch intakten Azinusgebieten dringen segmentkernige Leukozyten in die Nekrosezonen ein.

Das gleiche Bild entsteht durch Instillation von 1 ml der Enzymlösung. Hier finden sich nach 24 Stunden Leukozytenansammlungen auch um einige der erweiterten Ausführungsgänge, deren Epithelbelag stellenweise lückenhaft und rupturiert erscheint. Auch der Hauptgang ist betroffen, in dessen Lumen sich viele segmentkernige Leukozyten befinden.

Auch im Bereich des abgeplatteten, alterierten Epithels ist die Schleimschicht auf den Epithelzellen des Pankreasganges erhalten und bindet unverändert viel kolloidales Eisen. Die PAS-Alcianblau-Färbung führt an der Schleimschicht zu den gleichen Ergebnissen wie nach Instillation von Puffer.

Das Ödem und die nekrotischen Azini zeigen eine geringe Eisenbindung.

Auch bei weiteren Pankreaten zeigt sich 24 Stunden nach Instillation der Enzymlösung ein schweres, hämorrhagisches Ödem des Pankreas mit leukozytenüberwucherten, lobuluszentralen Azinusnekrosen.

48 Stunden nach Instillation von 0,4 bis 1,0 ml einer Neuraminidase-Lösung, entsprechend 0,062 bis 0,195 U Enzym, finden sich Zeichen einer abgelaufenen akuten Entzündung mit Bildung eines Granulationsgewebes, welches an Stelle untergegangener Azini tritt und das die ur-

Gruppe IV: sprüngleiche Organstruktur durch Aussplitterung der überlebenden Azini zerstört. In vielen Lobuli Zeichen von Obstruktion der Ausführungsgänge. Viele Rundzellen. Das Ödem ist bis auf Rest geschwunden.

72 und 96 Stunden nach Enzyminstillation findet sich eine Zunahme der Bindegewebswucherung und fortschreitende Atrophie der eingeschlossenen und von Obstruktion der regionalen Ausführungsgänge betroffenen Azini. Der Schleimbelag auf den Gangepithelien ist erhalten und gibt eine unveränderte Reaktion auf Alcianblau-Färbung und mit kolloidalem Eisen.

c. Instillation von 0,8 ml Neuraminidase-Lösung mit nachfolgender Gangligatur

24 Stunden nach Instillation von 0,8 ml Enzym-Lösung, entsprechend 0,16 U Neuraminidase, und anschließender Ligatur des Ductus pancreaticus finden sich großflächige, hämorrhagische Ödemseen im gesamten Pankreas, Nekrosen des retikulären Fettgewebes und totale und subtotale Lobulusnekrosen, wobei die zentralen Läppchenbezirke stets schwerer betroffen sind. Zum Teil sind die Nekrosezonen von segmentkernigen Leukozyten überwuchert.

Bei der HE-Färbung lassen die nekrotischen Azini teilweise noch schattenhaft ihre ursprüngliche Gestalt erkennen, teilweise sind die Azinusepithelien der Koagulationsnekrose zum Opfer gefallen. Man sieht dann nur noch hyaline, eosinrote tropfenartige Gebilde an Stelle der ehemaligen Azini. Die kleinen Ausführungsgänge in solchen Bezirken sind zerstört und nicht mehr darstellbar.

Das Ödem und das nekrotische retikuläre Fettgewebe stellen sich mit der Eisenbindungsreaktion blaßblau dar, die nekrotischen Azini binden teils wenig, teils viel Eisen.

Eine unverändert starke Eisenbindung zeigt der apikale Saum der Epithelien des Ductus pancreaticus, der eisenbindende Schleimbelag ist nach wie vor nachweisbar.

V. DISKUSSION

Das Vorkommen saurer Mucopolysaccharide im Gewebe, insbesondere im epithelialen Schleim, mit histochemischen Methoden zu untersuchen und dabei die sialinsäurehaltigen von den sialinsäurefreien zu unterscheiden, leidet unter dem Mangel an direkten Methoden zur Darstellung der Neuraminsäure. Eine Reihe von Verfahren wurde beschrieben und wieder verworfen (DIEZEL, 1957, SHEAR/PEARSE, 1963, RAVETTO, 1968, ZUGIBE, 1964). SCHMITZ-MOORMANN (1969) kommt zu dem Schluß:

"Demgegenüber ist histochemisch ein direkter färberischen Nachweis der Neuraminsäure bis heute nicht möglich; man kann lediglich mit der Alcianfärbung oder einer entsprechenden Farbreaktion ihren Säurecharakter nachweisen."

So wurden i n d i r e k t e Methoden entwickelt, bei denen man aus der Abnahme bestimmter Färbungen und Reaktionen nach selektiver Abspaltung der Neuraminsäuren durch Neuraminidase (GOTTSCHALK, 1960, 1972, QUINTARELLI, 1961, WARREN/SPICER, 1961) Rückschlüsse auf den ursprünglichen Gehalt an Sialinsäuren zu ziehen versuchte. Dieser Weg schlug fehl, da sich eine Reihe von Neuraminsäurederivaten gegenüber der Enzymwirkung resistent verhielt (SPICER und WARREN, 1960, RAVETTO, 1968).

Es wurden daher Verfahren erarbeitet, unter Ausnützung der Säurelabilität der ketosidische Bindung die Neuraminsäure durch saure Hydrolyse vom Restmolekül abzuspalten, wodurch ein indirekter Nachweis ermöglicht wurde.

Im Folgenden soll zunächst eine kurze Betrachtung der Schleimsubstanzen, ihrer Eigenschaften und färberischen Nachweise mit besonderer Berücksichtigung der Sialinsäure sowie eine Besprechung der angewandten Methoden erfolgen, um vor diesem Hintergrund zu einer Bewertung der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zu gelangen.

Drüsenepithel und Schleimssubstanzen

Grundsätzlich wird zwischen mesenchymalem und epithelialen Schleim unterschieden (LETTERER, 1932).

Die Mucopolysaccharide des mesenchymalen Schleims sind vor allem Hyaluronsäure und sulfathaltige, saure Polysaccharide, die keine

festen, kovalenten, sondern eine salzartige Bindung mit den Proteinen eingehen. Sie zeigen eine kräftige Metachromasie.

Schleimbildung ist vor allem eine Fähigkeit der Epithelzelle. Im Drüsenepithel werden eine Reihe ganz verschiedenartiger Schleimstoffe gebildet. Nach rein morphologischen Gesichtspunkten werden muköse und seröse Drüsen unterschieden. Eine histochemische Bedeutung hat diese Typisierung nicht, es soll lediglich die Viskosität des Sekrets gekennzeichnet werden. Auch in manchen morphologisch serösen Drüsen kommen kohlenhydrathaltige Schleimstoffe vor, wie der positive Ausfall der PAS-Reaktion zeigt.

Bei den mukösen Drüsen wird von manchen Autoren wegen färbischer Differenzen (Muzicarmin, Best's Carmin, Metachromasie-Test, PAS-Reaktion) zwischen "echten" mukösen und sogenannten "mucoiden" Schleimzellen unterschieden.

GRAUMANN (1964) betont demgegenüber, bei beiden handele es sich um echte Schleimzellen. Die färbischen Unterschiede zwischen mukösen und mucoiden Drüsen seien Unterschiede zwischen zwar verschiedenen, jeweils aber echten Schleimsubstanzen.

Chemisch sind Schleimstoffe Verbindungen von Proteinen und einer Kohlenhydratkomponente in Kovalenzbindungen, die von K. MEYER (1955) in neutrale und saure Mucopolysaccharide (MPS) eingeteilt werden. Saure MPS enthalten Glucuronsäure, einige haben durch Sulfatreste besonders sauren Charakter. Saure Mucopolysaccharide haben die typischen Eigenschaften von Polyanionen, zeigen also Metachromasie (RAPOPORT, S.M., 1969).

Neutralen MPS fehlen die Uronsäuren und das Sulfat, dafür finden sich neben Glucosamin weitere neutrale Zucker wie Galaktose, Mannose und Fucose.

RAPOPORT (1969) führt als ein Kennzeichen neutraler (!) Mukopolysaccharide die Gegenwart von Neuraminsäure an.

WERNER (1953) unterscheidet 2 Haupttypen von Schleimstoffen:

- 1) Fucomucan
- 2) Sialoproteid

Fucomucan ist das kennzeichnende und quantitativ vorherrschende MPS im schleimbildenden Epithel. Es ist ein neutrales, proteingebundenes Polysaccharid, welches am freien Ende der Kohlenhydratkette Fucose

trägt. Das in vielen Schleimen neben dem Fucomucan vorkommende Sialoprotein trägt am Ende der Kohlenhydratkette eine Sialinsäure, welche stark sauer ist.

Daneben kommt noch die bislang nur aus der Magenschleimhaut isolierte Mucoitinschwefelsäure vor, die wahrscheinlich auch Bestandteil der Darmschleimhaut ist. Keinesfalls aber ist sie als der typische Bestandteil aller epithelialen Schleime anzusehen (WERNER, 1953). Über das Vorkommen sulfatierter Mukopolysaccharide in den Becherzellen des Darmtraktes berichten JENNINGS und FLOREY (1956). Zu der Feststellung RAPOPORT's (1969), die Neuraminsäure sei ein kennzeichnender Bestandteil mancher neutraler Mucopolysaccharide steht im Gegensatz die Einordnung der Sialoproteide als saure MPS. In diesem Zusammenhang ist die Untersuchung von Z. DISCHE (1960) interessant, welcher über einen Austausch zwischen Sialinsäure und Fucose je nach Funktionszustand des Verdauungstraktes innerhalb des Kohlenhydratanteils der sezernierten Schleimstoffe berichtet: "The ability to replace fucose by sialic acid and vice versa as end groups of their carbohydrate may represent a fundamental structural property of glycoproteins related to their physiological functions."

Die Sialinsäuren - Chemie - Vorkommen - Bedeutung

"Sialinsäure" ist die Sammelbezeichnung für alle azetylierten Neuraminsäuren, deren Struktur diesen zugrunde liegt.

1936 isolierte BLIX aus den Schleimstoffen der Glandula submaxillaris des Rindes eine Monocarbonsäure, die sich mit Orcin / Salzsäurereagens rotviolett färbte.

KLENK gewann 1941 aus den Gangliosiden des Gehirns durch salzsaure Methanolyse eine saure Substanz, die er - ihrer Herkunft wegen - "Neuraminsäure" nannte und die die gleichen Reaktionen wie die BLIX'sche Carbonsäure zeigte.

Später spaltete GOTTSCHALK (1949, 1951) mit Hilfe hochgereinigter Influenza-Viren und eines Enzyms aus *Vibrio cholerae* von Mucoproteiden eine Substanz ab, die in ihren chemischen Eigenschaften sehr der von BLIX (1936) isolierten Säure glich.

In den folgenden Jahren wurden aus verschiedenen Materialien Neuraminsäurederivate isoliert. Die Aufklärung der Konstitution nahm eine lange Zeit in Anspruch, da reine Neuraminsäure in der Natur nicht vorkommt, sondern nur in Form von Acylderivaten, welche nach BLIX, GOTTSCHALK und KLENK (1957) auch Sialinsäuren genannt werden.

CORNFORTH et al. (1967) gelang aufgrund von GOTTSCHALK's (1955) Vermutung, die N-Acetylneuraminsäure (NANA) sei ein Aldolkondensat aus N-Acetylglucosamin und Brenztraubensäure, die erst Synthese von NANA aus N-Acetylglucosamin und Oxalessigsäure.

Durch Arbeiten von COMB und ROSEMAN (1958) konnte gezeigt werden, daß jedoch nicht das N-Acetylglucosamin, sondern das entsprechende Mannosederivat als Baustein der NANA anzusehen ist.

Die erfolgreiche Synthese der NANA aus Glucosamin wurde durch die im alkalischen Milieu leicht stattfindende Epimerisierung von N-Acetylglucosamin zu N-Acetylmannosamin erklärt.

Unsubstituierte Neuraminsäure ist nicht existenzfähig, da sie sich durch Kondensation der Aminogruppe an C-5 mit der Ketogruppe an C-2 sogleich zu einer inneren Schiff'schen Base umwandelt. Dies wird bei den natürlich vorkommenden Neuraminsäuren durch Substitution an der Aminogruppe (Acylierung) oder durch glykosidische Bindung an C-2 verhindert.

Acetylneuraminsäuren sind als α -Ketosäuren recht starke Säuren; ihre pK-Werte liegen - in Abhängigkeit von der N- oder O-Substitution - zwischen 1,8 und 2,6 (SVENNERHOLM, 1956, SCHEINTHAL und BETTELHEIM, 1968).

Über weitere chemische Eigenschaften und biochemische Nachweismethoden sei auf die entsprechenden Veröffentlichungen verwiesen (A. GOTTSCHALK, 1960, 1972, L. SVENNERHOLM, 1957, L. WARREN, 1959, D. AMINOFF, 1961) sowie auf die sehr instruktive Gesamtschau von R. SCHAUER (1973).

In der Natur liegen die Sialinsäuren meist in α -glykosidischer, säurelabiler Bindung an Kohlenhydrate vor. Überlicherweise nehmen sie das nicht reduzierte Ende der Heterooligosaccharidketten in Glykoproteinen (A. GOTTSCHALK, 1972) ein. Ihr Bindungspartner

ist N-Acetylgalaktosamin, wo sie glykosidisch an Hydroxylgruppen gebunden sind. Ebenso können die Sialinsäuren an die Hydroxylgruppe eines zweiten NANA-Moleküls gebunden sind.

Die Spaltung der glykosidischen Bindung erfolgt entweder besonders schonend und selektiv durch Präparationen des Enzyms "Neuraminidase" (GOTTSCHALK, 1960, 1972) oder mit Hilfe verdünnter Säuren (QUINTARELLI, 1961, GOTTSCHALK, 1957, KLESSEN, 1973).

Die biologischen Funktionen der Neuraminsäure sind vielfältig, entsprechend groß ist ihre Verbreitung. Sie sind nachgewiesen in Schleimsubstanzen des Verdauungstraktes, im Vaginalsehlim, im hochviskösen Schleimpfropf des Gebärmutterhalskanals, im Ejakulat, in der Zona pellucida der Eizelle von Säugern, im Bindegewebe, in Zellmembranen, im Serum und an vielen anderen Orten mehr. Vom Interesse sind hier lediglich ihre Eigenschaften in den Schleimstoffen des Verdauungstraktes.

GOTTSCHALK (1960) beschreibt einen deutlichen Abfall der Viskosität des Mucoproteins aus der Submaxillardrüse des Schweines, wenn mittels Neuraminidase NANA abgespalten wird. Er schreibt die viskositäts-erhöhende Wirkung der stark negativen Ladung der Neuraminsäure infolge ihres kräftigen Säurecharakters zu, wodurch das Molekül in gestreckter Form gehalten werde. Entsprechend berichtet GOTTSCHALK (1960) über eine Abnahme der Viskosität des NANA-haltigen Schleimes unterhalb des pK-Wertes der Sialinsäure, die sich als reversibel erwies, wenn das Milieu alkalischer wurde.

In der hohen Viskosität sieht GOTTSCHALK (1960) die Hauptfunktion der Sialinsäure, indem durch Einspeicheln die Nahrungsmittel gleitfähig gemacht und die zarten Schleimhäute vor mechanischen Schäden geschützt werden.

Weiter werde durch die endständigen Sialinsäuren die Angreifbarkeit des Mucoproteins aus der Submaxillardrüse des Schweins gegenüber Trypsin herabgesetzt (GOTTSCHALK, 1960), indem die Protease durch Sialinsäure sterisch behindert werden. Nach Abspaltung der NANA steige die Anzahl der durch Trypsin aus dem Mucoprotein erzeugbaren

Peptidkettenstücke um 45 % an. Nachdem im Magensaft Sialinsäure nachgewiesen wurde (J. WERNER, 1953, GLASS et al., 1968), lag die Vermutung nahe, die Magenschleimhaut werde durch sialinsäurehaltigen Schleim vor peptischen Ulzerationen bewahrt. DOMSCHKE et al. (1972) berichten von einem erniedrigten Gehalt des Magensaftes an Sialinsäuren bei Patienten mit Ulcus ventriculi, der nach entsprechender medikamentöser Therapie mit Ausheilung des Ulcus wieder auf normale Werte ansteige. Die NANA-Spiegel im Serum fand P. BÖHM (1959) bei Ulcus-Patienten nicht signifikant erniedrigt, beim schwer blutenden Ulcus hingegen stark erhöht.

L. CARLBORG et al. (1970) untersuchten das Verhalten der Sekretion von Salzsäure und Sialinsäuren nach Histamin-Infusionen bei Ulcus- und Magencarcinomträgern.

Sie fanden beim Gesunden bei Histamininfusion einen Anstieg der Säurekonzentration mit initialem Abfall der Sialinsäurekonzentration, welche später kompensatorisch anstieg. Ähnlich verhielten sich die Ulcusträger, wohingegen bei Carcinomträgern die HCl-Konzentration im Magensaft niedriger blieb, die Neuraminsäureausschüttung nach Histaminapplikation aber eher zunahm.

HOSKINS et al. (1963) konnten eine durch den Gehalt an Sialinsäure bedingte Resistenz des menschlichen Magenschleimes gegenüber der Trypsinverdauung nicht feststellen. Die Autoren führen diesen Widerspruch zu den oben erwähnten Befunden auf den relativ geringen Gehalt des Magenschleimes an Sialinsäure (2,1 %) gegenüber dem Glykoprotein aus der Submaxillardrüse des Schweines (24,5 %) zurück. SPIRO (1962) berichtet über ein Sialoprotein, dessen Verdauung durch Proteasen, einschließlich Pepsin und Trypsin, nach Abspaltung der Sialinsäure nicht zunimmt. HOSKINS et al. (1963) halten es daher für unwahrscheinlich, daß der geringe Anteil an Sialinsäuren im Magenschleim einen wichtigen Anteil an der Schutzfunktion gegen proteasenbedingte Autodigestion haben könne.

DISCHE (1960) untersuchte das Vorkommen von Fucose und Sialinsäure in den Glykoproteinen des Verdauungstraktes bei Gesunden und bei Kindern mit Mukoviszidose.

Er beschreibt die bereits erwähnte Austauschbarkeit zwischen Fucose und Sialinsäure in den Kohlenhydratseitenketten im Glykoproteinmolekül je nach Funktionszustand. So wurde beim Hund im Schleim der Submaxillardrüse eine Abnahme des Quotienten Sialinsäure/Fucose bei gleichbleibendem Quotienten (Sialinsäure + Fucose) / Hexosamin nach Stimulierung mit Pilocarpin beobachtet. Eine Zunahme der Fucose bei gleichzeitigem Rückgang der Sialinsäure im Molekül verschlechtert nach DISCHE die Löslichkeit des Glykoproteins in Wasser / Alkohol- und Wasser / Aceton-Gemischen.

Bei Mukoviszidose fand DISCHE (1960) eine starke Verschiebung des Verhältnisses Sialinsäure / Fucose zuungunsten der Sialinsäure, was mit einer starken Abnahme der Löslichkeit dieser Glykoproteine in Wasser / Alkoholgemischen einhergeht.

Von DISCHE (1960) stammen auch Angaben über den Gehalt an Sialinsäuren im Pankreassaft bei Patienten mit Verschuß des Ductus pancreaticus durch einen Stein (1.1 %) und akuter Pankreatitis (0.98 %).

Histochemische Nachweismethoden für Mucopolysaccharide

Die älteren "spezifischen" Schleimfärbungen, wie die Färbung mit Mucocarmin oder Best's Carmin, sollen hier außer Acht gelassen werden.

PAS-Reaktion: Von großer Bedeutung für den färberischen Nachweis der MPS ist hingegen die Perjodat-Leukofuchsinreaktion, auch PAS (= periodic acid Schiff) - Reaktion genannt, die von Mc MANUS, 1945, LILLIE, 1947, u.a. eingeführt wurde.

Durch diese Reaktion werden die für Glykoproteine charakteristischen Heterooligasaccharidketten nachgewiesen - und zwar durch Reaktion der benachbarten Hydroxylgruppen im Kohlenhydratmolekül.

Die Perjodsäure spaltet die Bindung zwischen den beiden benachbarten Hydroxylgruppen tragenden C-Atomen unter Bildung von Aldehyden oxydativ auf;

PAS-Reaktion:

die entstandenen Aldehyde werden durch fuchsin-schwefelige Säure ("Schiff'sches Reagens") unter Bildung einer rotvioletten, purpurfarbenen Verbindung dargestellt.

Selbstverständlich zeigen alle im Gewebe befindlichen Oligo- und Polysaccharide mit freien, benachbarten Hydroxylgruppen diese Reaktion, auch das Glykogen. Dieses kann durch Vorbehandlung des Schnittes mit Amylase jedoch in löslicher Bruchstücke aufgespalten und so aus dem Gewebe entfernt werden.

Auch Neutralfette geben, sofern sie reaktionsfähige Doppelbindungen haben, eine positive Reaktion mit Schiff'schem Reagens nach Voroxydation (ARNOLD, 1968).

Mucopolysaccharide, deren OH-Gruppen verestert sind wie z.B. bei den sauren Mucopolysacchariden, geben keine positive PAS-Reaktion, ebensowenig wie Kohlenhydrate, deren Hydroxylgruppen durch glykosidische Bindung blockiert sind. Es werden also ausschließlich neutrale MPS mit freien Hydroxylgruppen gefärbt.

Sialinsäure besitzt an C-7 bis C-9 benachbarte Hydroxylgruppen. So führt QUINTARELLI (1961) die verminderte PAS-Reaktion an den Acini der Submaxillardrüse nach saurer Hydrolyse auf den infolge Abspaltung fehlenden Anteil der Sialinsäure an der PAS-Reaktion zurück.

Im Gegensatz dazu beobachten SPICER und WARREN (1960), WARREN und SPICER (1961) und KLESSEN (1973) keine Verminderung der PAS-Reaktion nach Abspaltung der Neuraminsäure. Danach nimmt die Sialinsäure trotz vicinaler OH-Gruppen nicht an der PAS-Reaktion teil. KLESSEN (1973) erklärt dies dadurch, daß nach Perjodsäureoxydation am Neuraminsäuremolekül nach Abspaltung von Formaldehyd und Ameisensäure nur eine Aldehydgruppe zur Reaktion mit Schiff'schem Reagenz

PAS-Reaktion: verbleibt, wodurch die Erfassungsgrenze nicht überschritten werde. Außerdem liege bei dem pH 2.1 der üblicherweise verwendeten 0.5 % Perjodsäure ein großer Teil der Sialinsäure in Ionenform vor, was zur elektrostatischen Abstoßung zwischen Sialinsäure und Perjodsäure führe. Zudem sei eine Abspaltung der säurelabil gebundenen Neuraminsäure nach Voroxydation mit Perjodsäure anzunehmen (KLESSEN, 1973).

Alcianblau-Reaktion: Durch Alcianblau - die Färbung mit Alcianblau 8 GS wurde 1950 von STEEDMAN zur Darstellung saurer Mucopolysaccharide vorgeschlagen - werden saure Komponenten blau dargestellt. Der Farbstoff gehört zur Gruppe der stark basischen Kupferphthalocyanine und soll mit den Carboxyl- und Sulfatgruppen saurer Mucopolysaccharide eine Salzbindung eingehen.

In der Modifikation nach GOMORI (1954) mit Alcianblau - 8 G (ohne Eisessigzusatz) wird nach Blockierung der Carboxylgruppe die Reaktion negativ (ARNOLD, 1968).

PAS-Alcian-Reaktion: Die kombinierte Anwendung der PAS- und Alcianblau-Reaktion nach MOWRY und WINKLER (1956) erlaubt die gleichzeitige Darstellung saurer und neutraler MPS. Erstere färben sich blau-violett, letztere rot-violett bzw. purpur (WARREN und SPICER, 1960).

Eisenbindungsreaktion: Von HALE (1946) wurde eine Methode zur Darstellung saurer Mucopolysaccharide entwickelt. Es zeigte sich jedoch bald, daß das Verfahren (Anlagerung von Eisen an saure Mucopolysaccharide und Nachweis desselben mittels der Berliner-Blau-Reaktion) in der

Eisenbindungsreaktion: von HALE beschriebenen Form als durchaus unspezifisch anzusehen ist (PEARSE, 1953, DAVIES, 1952, LISON, 1953).

Neben Chondroitinsulfat, Heparin, Hyaluronsäuren und sauren Mucopolysacchariden aus verschiedenen Geweben reagierten auch neutrales Mucopolysaccharid vom Magen und Casein (G. MÜLLER, 1955).

Von MÜLLER (1955) stammt der Vorschlag einer Vereinfachung der Reaktion nach HALE. Auch diese Modifikation trug nicht wesentlich zur Steigerung der Spezifität bei.

GRAUMANN (1958) untersuchte verschiedene andere Modifikationen der Polysaccharid-Eisenreaktion, wobei die Modifikationen nach RINEHARDT u. ABULHAJ (1951), nach MÜLLER (1955) und nach GOMORI (1954) untereinander und mit dem Ausfall weiterer Methoden (Aldehydfuchsin, Alcianblau, Metachromasie) verglichen wurden. Am meisten spezifisch für die Darstellung sauren Schleimes erwies sich die Modifikation nach GOMORI (1954).

GRAUMANN und CLAUSS (1958) beschrieben kurz darauf eine eigene Modifikation der Eisenbindungsreaktion, welche eine ausreichende Spezifität für saure MPS bei guter Empfindlichkeit gewährleisten soll. Die Steigerung der Spezifität soll durch eine stärkere Ansäuerung der kolloidalen Eisenlösung auf pH 1,15 und Spülen in 5 %iger Essigsäure statt Aqua dest. erreicht werden.

Der niedrige pH-Wert der kolloidalen Eisenlösung drängt die Dissoziation aller sauren Gruppen im Gewebe zurück, so daß nur noch stark saure Gruppen mit niedrigem pK-Wert zur Eisenanlagerung befähigt sind. Durch Spülen in 5%iger Essigsäure soll unspezifisch gebundenes Eisen wieder aus dem Gewebe entfernt werden.

Eisenbindungsreaktion: Die Eisenbindungsreaktion kann vorteilhaft auch bei elektronenoptischen Untersuchungen eingesetzt werden, die Berliner-Blau-Reaktion braucht dabei nicht durchgeführt werden, wegen der dabei entstehenden Teilchengröße von 500 Å wäre dies sogar schädlich (M. ARNOLD, 1971). GRAUMANN (1958) gibt für die von ihm und CLAUSS entwickelte Modifikation eine vollständige Übereinstimmung mit der Alcianblau-Reaktion und dem Metachromasie-Test an.

Als weiteres Verfahren zur Darstellung saurer Mucopolysaccharide dient der Test auf Metachromasie, die von EHRLICH erstmals beschrieben wurde. Unter Metachromasie versteht man das Auftreten einer vom Farbton der Farblösung abweichenden Farbe im Schnitt (ARNOLD, 1968). Die Fähigkeit zur Metachromotropie besitzen nur Polyanionen mit stark sauren Komponenten.

Metachromotropie zeigen in abnehmender Stärke sulfat-, phosphat- und carboxylgruppentragende Mucopolysaccharide.

Es entscheidet aber nicht nur alleine die Stärke der vorhandenen anionischen Gruppe darüber, ob Metachromasie auftritt, sondern auch deren Anzahl und Dichte. Substanzen mit Carboxylgruppen reagieren nur bei hoher Ladungsdichte metachromotrop (ARNOLD, 1968).

Histochemie der Sialinsäure

Analog zum biochemischen Nachweis lag es nahe, den färberischen Nachweis von Sialinsäure im Gewebe mit BIAL'schem Reagens zu erbringen. Dies versuchte DIEZEL (1957) mittels dem von ihm angegebenen Verfahren.

Es häufte sich jedoch Kritik an dem Verfahren: P. BÖHM (1959) teilt ausdrücklich mit, trotz der empfindlichen Anfärbungen der Neuraminsäure - derivate mit BIAL'schem Reagens in vitro sei der histologische Nachweis im Gewebeschnitt mißlungen. Die zur Farbentwicklung neuraminsäurehaltiger Strukturen notwendigen Temperaturen zerstörten bei der hohen Salzsäurekonzentration das Gewebe vollständig. Mit dem Verfahren nach DIEZEL (1957)

sei es ihm nicht gelungen, Sialinsäure in histologischen Schnitten bei einem Fall von Amaurotischer Idiotie (TAY-SACHS) nachzuweisen, wohingegen mit dieser Methode Sialinsäure im Skelettmuskelpräparat dargestellt werde, was im Gegensatz zu in-vitro-Versuchen stände.

SHEAR und PEARSE (1963) führen das Versagen der Methode in der Vorschrift nach DIEZEL (1957) auf die Verwendung von Orzein zurück. Positive Ergebnisse seien aber nur bei Verwendung von Orzin zu erwarten.

Da Orzein sich gelegentlich spontan zu Orzin umbildet, seien histologische Darstellungen von Sialinsäure bisweilen auch nach der Vorschrift von DIEZEL positiv. SHEAR und PEARSE (1963) empfehlen, statt Orzein Resorcin zu verwenden. Zur Fixierung des Gewebes müssen die Gefrierschnitte mit Formaldehyd-Dämpfen behandelt werden.

RAVETTO (1964) nimmt die Zerstörung der Gewebeschnitte bei der Methode nach DIEZEL (1957) zum Anlaß, eine schonendere Modifikation zu beschreiben, bei der er das nach SVENNERHOLM (1957) modifizierte BIAL'sche Reagens verwendet, welches Orzin enthält. Auch RAVETTO (1964) schreibt eine Fixierung der Gefrierschnitte in Formaldehyd - hier in Formalin - vor.

Gegen die von SHEAR und PEARSE (1963) entwickelte Methode zur direkten Darstellung der Sialinsäure im Gewebeschnitt wenden ZUGIBE et al. (1964) ein, mit dem angegebenen Verfahren werde nicht die Neuraminsäure, sondern lediglich im Gewebe von der Fixierung verbliebenes Formaldehyd dargestellt. Dies wird durch Experimente eindrucksvoll belegt.

Die beschriebenen Erfahrungen decken sich voll mit den eigenen Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung: Abgesehen davon, daß bei der Anwendung der Methode nach DIEZEL (1957) von 10 Schnitten kaum einer in einem gerade noch verwertbaren Zustand zurückblieb, so zeigten diese Präparate nur in den Randzonen des Schnittes, die der Einwirkung der stark sauren, formalinhaltigen Fixierlösung nach BOUIN am meisten ausgesetzt waren, eine fleckige, verwaschene Rötung, die auf die Azini zu beziehen war, ein Befund, auf den unten noch besonders eingegangen werden muß.

Ein anderes direktes Verfahren zur färberischen Darstellung der Sialinsäure ist nicht eingeführt, es gilt die Feststellung von SCHMITZ-MOORMANN (1969), histochemisch sei der direkte Nachweis der Neuraminsäure bis heute nicht möglich, man könne lediglich mit einer entsprechenden Farbreaktion ihren Säurecharakter nachweisen.

Somit war man gezwungen, eine histochemische Darstellung der Neuraminsäure mit indirekten Methoden zu erzielen, indem man aus der Abschwächung bestimmter, für saure Mucopolysaccharide spezifischer Färbungen nach selektiver Abspaltung der Neuraminsäure auf deren Anwesenheit Rückschlüsse zog.

Als Methoden zum Nachweis saurer Mucopolysaccharide einschließlich der Sialproteine haben sich hauptsächlich die Alcianblau-Reaktion (RAVETTO, 1968, SCHMITZ-MOORMANN, 1969), oft als Kombinationsfärbung zusammen mit der PAS-Reaktion (SPICER und WARREN, 1960, SPICER et al., 1960, QUINTARELLI et al., 1961, WARREN und SPICER, 1961), sowie die Eisenbindungsreaktion mit kolloidalen Eisen (QUINTARELLI, 1961, GRAUMANN, 1958, SCHMITZ-MOORMANN, 1969, KLESSEN, 1973) bewährt.

Zur selektiven Abspaltung der endständigen Sialinsäuren bietet sich als eleganteste Methode die Verwendung von Neuraminidase an, die aus dem Influenza-Virus, aus *Vibrio cholerae* und *Clostridium perfringens* sowie vielen anderen Bakterien gewonnen werden kann (GOTT-SCHALK, 1972).

Die natürlichen Substrate der Neuraminidase sind alle α -Ketosidischen Bindungen von NANA.

Im Handel befinden sich vor allem Neuraminidase-Präparationen aus *Vibrio cholerae* mit einem pH-Optimum von 5,6 und einer K_m von 1×10^{-3} sowie aus *Clostridium perfringens*, pH-Optimum bei 4,5; K_m 2×10^{-3} (GOTTSCHALK, 1972).

Wird ein Gewebeschnitt für 24 Stunden bei 37°C und pH 4,5 - 5,5 mit Neuraminidase inkubiert, so resultiert eine weitgehende bis vollständige Freisetzung der gebundenen Sialinsäuren.

Als bald erschienen jedoch Untersuchungen, die von einem Versagen des indirekten Nachweises von Sialinsäuren mittels Neuraminidase in Geweben berichteten, in denen mit biochemischen Methoden ein hoher Gehalt an Sialinsäuren gefunden worden war. Dennoch konnte aus diesen Geweben keine Neuraminsäure mit Hilfe der Neuraminidase freigesetzt werden (SPICER und WARREN, 1960, QUINTARELLI et al., 1961). Die Gründe dafür wurden teils in einer andersartigen Bindung der Sialinsäure an das Restmolekül gesucht (WARREN und SPICER, 1961). Teils machte man die Anzahl und Art der Substituenten am Neuraminsäuremolekül dafür verantwortlich (FAILLARD, 1959, GIBBONS, 1963, RAVETTO, 1968, GOTTSCHALK, 1972).

Die letzte Ansicht wird durch verschiedene Ergebnisse untermauert. So erwiesen sich die N-acetyl-O-acetylneuraminsäuren und N-acetyl-4,7 (oder 8 o.9) - die - O-acetylneuraminsäuren resistent gegenüber der hydrolytischen Abspaltung durch die Neuraminidasen von *Vibrio cholerae* und *Clostridium perfringens* (GOTTSCHALK, 1972). Nach Abspaltung der Azetylgruppen durch milde Alkalibehandlung erwiesen sich die Sialinsäuren als Neuraminidase-empfindlich (RAVETTO, 1968).

Vor allem in Schleimsubstanzen der Ratte wurde neuraminidaseresistente Sialinsäuren gefunden, auch beim Menschen sollen diese verbreitet sein (GIBBONS, 1963).

Als zweiter Weg bei Resistenz der Sialinsäuren gegenüber der Neuraminidase bietet sich an, die Säurelabilität der α -ketosidischen Bindung der Neuraminsäure anzunutzen.

Nach QUINTARELLI (1961) ergab sich "that when bovine submaxillary gland mucin was treated at pH 1.0 and 80°C, sialic acid, and sialic acid only, was released from the submaxillary mucoprotein."

QUINTARELLI (1961) fand ein völlig übereinstimmendes Verhalten der Submaxillardrüse des Rindes bezüglich der Alcianblau-Färbung, der Prüfung auf Metachromasie und der PAS-Reaktion nach Säurehydrolyse oder nach Inkubation mit Neuraminidase.

KLESSEN (1973) berichtet über ein übereinstimmendes Ergebnis der Eisenbindungsreaktion (Modifikation nach GRAUMANN / CLAUSS, 1958) bei der Darstellung von Sialinsäure in der Rattenhypophyse nach Inkubation mit Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* oder nach saurer Hydrolyse.

Zur Abspaltung der Neuraminsäure aus dem Gewebe mittels Säurehydrolyse werden verschiedene Verfahren beschrieben. Nach PUSZTAI und MORGAN (1961) führt die Inkubation eines sialinsäurehaltigen MPS bei pH 2.0 und 37°C für 24 Std. zur quantitativen Abspaltung der Sialinsäure.

QUINTARELLI et al. (1961) führten ihre Hydrolyseversuche mit 0.02 N Natriumazetat und 0.02 N HCl, pH 2.5; 0.2 M Azetatpuffer, pH 4.3 und 0.01 M Citratpuffer, pH 7.0, durch. Die Inkubationszeiten betrugen 30 Minuten, 1, 2; 4 und 6 Std., die Temperaturen 37°, 55°, 65° oder 85°.

Nach einer 4-stündigen Inkubation bei pH 2.5 und 70°C wurde im Gewebe keine Alcianblaufärbung mehr beobachtet.

KLESSEN (1973) fand bei saurer Hydrolyse von Hypophysenschnitte der Ratte über 24 Std. bei 37°C unterhalb von pH 3.5 eine rasche Abnahme der Eisenbindungsreaktion, unterhalb von pH 1.5 stellten überhaupt keine eisenpositiven Zellen mehr dar.

Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse scheint es gerechtfertigt, allein aus dem Verhalten der Eisenbindungsreaktion und der Alcianblaufärbung nach milder, saurer Hydrolyse auf das Vorhandensein von Sialinsäure im Gewebe schließen zu können, wenngleich ein letzter Beweis damit nicht erbracht ist.

BESPRECHUNG DER EIGENEN ERGEBNISSE

a) Einfluß der Fixierung

Das Ergebnis der Eisenbindungs- oder PAS-Alcianblau-Reaktion ist abhängig von der angewandten Fixierungsmethode.

So ist bei der Fixierung mit BOUIN'schem Gemisch die Reaktion des kollagenen und lockeren interazinären Bindegewebes nach Alcianblau-Färbung deutlicher als bei Fixierung nach ELFTMAN (1957).

Die nach ELFTMAN fixierten Präparate zeigen dafür die konstantere Reaktion des apikalen Epithelsaumes der Gangepithelien und deren Schleimbelag.

Der unterschiedliche Ausfall der Eisenbindungsreaktion bei den menschlichen Pankreaten ist besonders evident: Während bei der Fixierung nach ELFTMAN (1957) die basalen Abschnitte der Azinus-epithelien gerade in der Peripherie des Schnittes betont kräftig durch die Eisenbindungsreaktion dargestellt werden, reagieren diese bei Fixierung nach BOUIN in den Randbezirken überhaupt nicht. Dafür sind die apikalen Epithelabschnitte dargestellt.

KLESSEN (1973) berichtet über ein Versagen des Nachweises von Sialoproteinen in BOUIN-fixierten Schnitten der Rattenhypophyse. Er weist darauf hin, daß es sich bei dem Gemisch nach BOUIN um ein sehr saures Fixierungsmittel - pH 2,1 (ARNOLD, 1968) bzw. 1,6 (KLESSEN, 1973) - handelt, bei dessen Benutzung man bereits bei der Fixierung mit einem unkontrollierbaren Verlust an säurelabil gebundener Neuraminsäure rechnen müsse.

Durch Verwendung nicht saurer Fixierungsmittel, wie das von ELFTMAN (1957) für die Fixierung der Hypophyse vorgeschlagene Chrom-alaun-Formol-Sublimat, läßt sich die Möglichkeit unkontrollierbarer Sialinsäureverluste verringern.

Bei Verwendung der Fixierung nach ELFTMAN (1957) kann auch an anderen Organen als der Hypophyse die erzielte Strukturhaltung als befriedigend angesehen werden.

Bei der folgenden Besprechung der färberischen Ergebnisse sollen daher lediglich die nach ELFTMAN fixierten Schnitte berücksichtigt werden.

b) Mucopolysaccharide in Geweben der Ratte.

Die Darstellung saurer Mucopolysaccharide (MPS) gelingt mit der Eisenbindungsreaktion besser als mit der Alcianblau-Reaktion. Dies deckt sich mit Beobachtungen von KLESSEN (1973), der der Alcianblau-Färbung eine geringere Empfindlichkeit anlastet. Der färbereische Nachweis von Sialinsäure mit Alcianblau gelinge nur in Geweben und Substanzen mit hohen Konzentrationen der Neuraminsäure z.B. in den Schleimen bestimmter Speicheldrüsen.

ARNOLD (1971) begründet die höhere Empfindlichkeit der Eisenbindungsreaktion mit der Größe der kolloidalen Eienteilchen (50-100 Å), wodurch bereits eine geringe Dichte saurer Gruppen genüge, um maximale Reaktion zu erzielen.

Durch das saure pH des Färbekades bei der Eisenbindungsreaktion (pH 1,6) seien alle sauren Gruppen in ihrer Dissoziation soweit zurückgedrängt, daß vorzugsweise SO_3^- OH-Gruppen tragende Strukturen für die Eisenanlagerung in Frage kämen, da deren pK am niedrigsten sei. Demgegenüber betont KLESSEN, die bei pH 1,6 vorliegenden 9 % der Sialinsäure in dissoziierter Form seien gerade wegen der hohen Empfindlichkeit der Eisenbindungsreaktion ausreichend, um zu einer lichtoptisch nachweisbaren Eisenanlagerung zu führen.

Außerdem bezieht sich die Angabe von 9 % dissoziierter Sialinsäure bei pH 1,6 auf einen pK 2,6, je nach Art der N- oder O-Substitution kann dieser jedoch auch bei 1,8 liegen (SVENNERHOLM, 1956, SCHEINTHAL und BETTEHEIM, 1968) -2,6 ist der pK der N-acetyl-Neuraminsäure- wodurch ein größerer Anteil der Sialinsäure dissoziiert wäre.

Mit der PAS-Alcian-Methode gelingt ein Nachweis saurer MPS im Schleimbelag des Pankreasganges, ferner im Schleim der Becherzellen des Duodenum, im Schleim und in den Epithelien des oberflächlichen Bereiches der Drüenschläuche (nicht Foveolae!) in der Magenschleimhaut sowie in den basalen Drüenschläuchen der Pylorusschleimhaut. Bei letzteren fällt die reine Blaufärbung, d.h. die fehlende PAS-Reaktion auf!

Die Epithelien der Duodenalschleimhaut, der oberflächlichen Pylorusdrüsen sowie die Epithelien der Foveolae gastricae geben eine reine PAS-Reaktion, was auf die Anwesenheit neutraler MPS schließen läßt.

Auch die Granula in den Epithelien des Ductus pancreaticus zeigen - im Gegensatz zum oberflächlichen Schleimbelag - eine mehr rot-violette Färbung, welche von basal Richtung lumenseitiger Oberfläche in blauviolett übergeht. Die Anzahl saurer Gruppen im Schleim der Pankreasgangepithelien nimmt also in Richtung Lumen zu.

Das Bindegewebe von Magen und Darm sowie im Pankreas zeigt mit der PAS-Alcianmethode die Reaktion neutraler MPS, lediglich submesothelial und in der Submucosa finden sich Anzeichen für saure Gruppen. Die Basalmembranen der Azinusepithelien zeigen reine PAS-Reaktion. In den Azinusepithelien des Pankreas läßt der Ausfall der PAS-Alcian-Reaktion auf die Anwesenheit saurer MPS in der Zymogenzone schließen.

Dieser Befund wird durch das Ergebnis der Eisenbindungsreaktion gestützt, durch welche in den apikalen Zonen der Azinusepithelien blaugrüne Granula dargestellt werden können.

Im Vergleich zur PAS-Alcian-Methode werden mit der Eisenbindungsreaktion wesentlich mehr saure MPS dargestellt.

Saure MPS finden sich am apikalen Epithelsaum auch der kleinsten Ausführungsgänge im Pankreas.

Zusätzlich zu den durch die Alcianblau-Färbung nachgewiesenen sauren MPS im Ductus pancreaticus, im Schleim der Becherzellen des Duodenum sowie in den oberflächennahen Anteilen der Drüsen-schläuche des Magens und in den basalen Pylorusdrüsen reagieren auch die Epithelien der Foveolae gastricae (blaue Granula im apikalen Zytoplasma) und die Epithelien der oberflächlichen Anteile der Drüsen-schläuche in der Pylorusschleimhaut, letztere jedoch nur ganz schwach.

Unmittelbar basal der Schleimhautepithelien von Magen und Darm, der Epithelien des Ductus pancreaticus und um die Azini stellt sich eine dünne Lamelle mit stärkerer Eisenanlagerung dar, die Basalmembran. Bei den nach BOUIN fixierten Präparaten findet sich keine positive Eisenbindungsreaktion an den Grundhäutchen.

Eine kräftige Eisenbindungsreaktion zeigt das kollagene Bindegewebe um die Gänge und Gefäße, eine schwächere des retikuläre Bindegewebe bzw. Fettgewebe des Mesenterium. Demgegenüber bezeichnet GEYER (1957) die Kollagenfaser als nicht-eisenbindend, eine Eisenbindungsreaktion der Basalmembran lehnt der Autor nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen an den Basalmembranen der Nierenglomerula ab.

In der vorliegenden Untersuchung ist die Eisenbindungsreaktion am kollagenen Bindegewebe gesichert. Gerade dort, wo das Bindegewebe in einzelnen Fasern aufgesplittert ist, zeigt sich eine kräftige blaue Darstellung der einzelnen Faserstrukturen. Daß in der reifen Kollagenfaser Kohlenhydrate in die Fibrille selbst eingebaut sind - bei der unreifen finden sich diese nur in der Kittsubstanz - hat GRAUMANN (1964) nachgewiesen. Die Eisenbindungsreaktion, womit saure MPS in der Kollagenfaser zumindest wahrscheinlich gemacht werden können, ist bei der Fixierung mit BOUIN'schem Gemisch wesentlich schwächer, in randständigen Partien sogar negativ. Dieser Einfluß der Fixierung ist vielleicht die Erklärung für die sich widersprechenden Ergebnisse.

Die Ergebnisse der Eisenbindungsreaktion an den Basalmembranen sind in der vorliegenden Untersuchung nicht eindeutig. An der Basalmembran der Azini im Pankreas ist die Eisenbindung gesichert, an der von Epithelien des Pankreasganges und Schleimhäuten von Magen und Darm wahrscheinlich (Strukturerhaltung nicht ausreichend).

Eine endgültige Aussage über den Gehalt der Basalmembran an sauren MPS kann nicht gemacht werden. Der Gehalt an neutralen MPS ist gesichert.

Über die Konzentration saurer Gruppen in Schleimstoffen und Gewebe läßt sich nach dem Ausfall der Eisenbindungsreaktion folgendes sagen:

- Hohe Konzentration:
- Schleimbelag und eisenbindende Granula der Epithelzellen des Pankreasganges
 - Schleim der Becherzellen
 - Schleim der Epithelien der oberflächlichen Bereiche der Drüenschläuche in der Magenschleimhaut
 - Epithel und Schleim der Foveolae gastricae
- Mittlere Konzentration:
- Kollagenes Bindegewebe
 - interazinäres Bindegewebe
 - Basalmembran der Azini
- geringe Konzentration:
- Zymogenbereich der Azinusepithelien
 - retikuläres Binde- und Fettgewebe des Mesenterium
 - oberflächlicher Anteil der Drüenschläuche der Pylorusschleimhaut
 - einzelne Zellen in Drüenschläuchen der Magenschleimhaut (Belegzellen) sowie basale Epithelien am blinden Ende der Drüenschläuche
 - Zottenstroma und interstitielles Bindegewebe der Schleimhäute.

Kein Nachweis saurer MPS, wohl neutraler, gelingt in Epithel und Schleim der Duodenaldrüsen sowie im Kutikularsaum der Darmepithelien.

Nach Inkubation der Schnitte in Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, bei 70°C für 1 Stunde ist ein Nachweis saurer MPS mittels der PAS-Alcian-Reaktion nicht mehr möglich: Die Schleime von Pankreasgang, Becherzellen und Magenschleimhaut, oberer Anteil der Drüenschläuche, stellen sich nur rotviolett dar. Die PAS-Reaktion wird durch Inkubation in mit Natriumazetat auf pH 2,5 eingestellter Essigsäure nicht verändert.

Unverändert bleibt der Ausfall der Eisenbindungsreaktion nach Vorbehandlung mit Natriumazetat / Essigsäure, pH 2,5, an diesen Schleimstoffen.

Die Reaktion der Schleimstoffe an den drei Orten ist völlig übereinstimmend - eine histochemische Identität kann angenommen werden.

Verwirrend erscheint das gegensätzliche Verhalten der PAS-Alcian-Methode gegenüber dem Ausfall der Eisenbindungsreaktion nach Säurebehandlung.

Die negative Alcianblau-Reaktion nach Säurebehandlung bei pH 2,5 deutet auf einen Verlust an sauren Komponenten hin, bei denen es sich unter den gegebenen Bedingungen nur um Sialinsäuren gehandelt haben kann.

Die Eisenbindungsreaktion zeigt keinen Verlust an sauren Gruppen an. Es sind also noch in großem Umfang saure MPS vorhanden, die von der Alcianblau-Reaktion nicht erfaßt werden. Der Anteil der Sialinsäuren in diesen Schleimen ist offenbar so gering, daß ihr Fehlen sich nicht in einer Verminderung der Eisenbindungsreaktion äußert.

Nach SPRINGER (1954, 1955) herrschen im Schleim der Becherzellen fucosehaltige, neutrale, teilweise blutgruppenaktive Mucoide vor, denen saure, sulfathaltige Komponenten beigemischt sind. Nach DISCHE (1960) sind Fucose und Sialinsäure in der Kohlenhydratseitenkette des Mucoidmoleküls austauschbar und wechseln in ihrem Gehalt je nach Funktionszustand des Drüsenepithels.

Andererseits ist bekannt, daß durch Alcianblau in Kombination mit der PAS-Reaktion verschiedene, stark saure, metachromatische Mucopolysaccharide nicht dargestellt werden (SPICER, 1960).

Es bleibt daher zu prüfen, inwieweit die positive Alcianreaktion durch in ausreichender Anzahl vorhandene Sialoproteine gegeben wird, während die auch nach einstündiger Inkubation in 1,0 M HCl noch starke Eisenbindung durch stark saure, sulfathaltige MPS verursacht wird, mit denen Alcianblau in Kombination mit PAS nicht reagiert.

Bemerkenswert ist auch das Verhalten der Epithelien der basalen Drüsenschläuche in der Pylorusschleimhaut gegenüber der PAS-Alcianblau-Reaktion. Nach Exposition zu pH 2,5 zeigen diese eine - wenn auch im Vergleich zu den oberflächlichen Epithelien schwache - PAS-Reaktion, während sie sich ohne Vorbehandlung rein blau darstellen. Offenbar blockieren die durch Säurehydrolyse abspaltbaren sauren Gruppen die PAS-Reaktion. Die Eisenbindungsreaktion ändert sich nach Säurebehandlung nicht.

Die Vorbehandlung mit Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, führt bei den Duodenaldrüsen überraschenderweise zu einer nachfolgenden, wenn auch ganz schwachen Eisenbindungsreaktion. Ohne Vorbehandlung sind die BRUNNER'schen Duodenaldrüsen bei der Eisenbindungsreaktion völlig reaktionslos. Da die PAS-Reaktion unverändert bleibt, ist eine Abspaltung von Kohlehydratseitenketten mit Freilegung saurer Gruppen an den Peptidketten unwahrscheinlich. Eine Erklärung kann also nicht gegeben werden.

Der übrige Ausfall der Eisenbindungsreaktion im Pankreas nach Inkubation in Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, läßt darauf schließen, daß es sich bei den sauren MPS im apikalen Bereich der Zymogengranula um Sialomuzine handelt. Dies steht in Übereinstimmung mit Verhalten der PAS-Alcian-Reaktion. Das Verhalten von interazinärem Bindegewebe und retikulärem Fettgewebe gegenüber der Eisenbindungsreaktion nach Säurehydrolyse spricht für die Anwesenheit von Sialomuzinen, deren Konzentration die für eine positive Alcianreaktion notwendige Menge nicht erreicht.

Die durch Inkubation in 0.1 M HCl fehlende Eisenbindung des Epithels der Foveolae gastricae ist schwer zu begründen. Sie kritiktlos einer erst bei Inkubation in 0.1 M HCl erfolgten Abspaltung von Sialinsäure zuzuordnen, erscheint fragwürdig, da das Epithel der Foveolae keine Alcianblau-Reaktion zeigt.

Bei alleiniger Alcianblau - 8 G - Färbung stellen sich nur die Epithelien der oberen Anteile der Drüenschläuche in der Magenschleimhaut dar.

Eine Erklärung könnte auch hier eventuell in einer für den Nachweis durch Alcianblau zu geringen Konzentration von Sialinsäure im überwiegend fucosehaltigen Schleim der Magenrübchen gefunden werden.

Die Tatsache, daß es bezüglich der Bereitschaft der Sialinsäuren, durch Inkubation in saurem Milieu von der Kohlenhydratseitenkette des Mucoidmoleküls abgespalten zu werden, Unterschiede gibt, ist bekannt. So berichtet GIBBONS (1963) von einer gewissen Resistenz der Sialinsäuren, die durch Neuraminidase nicht abgespalten werden können, auch gegenüber der Säurehydrolyse.

Die Inkubation der Gewebeschnitte mit Neuraminidase vermag die Eisenbindungsreaktion der apikalen Azinusepithelabschnitte, der als Basalmembran angesehenen Strukturen um die Azini und des interazinären Bindegewebes zu vermindern bzw. aufzuheben. Ebenso ist die Eisenbindungsreaktion am Mesothel und retikulären Fett- und Bindegewebe, am kollagenen Bindegewebe um Gänge und Gefäße des Pankreas und an der Submucosa des Duodenum abgeschwächt bis aufgehoben. Im Zusammenhang mit dem Ausfall der Eisenbindungsreaktion nach Säurehydrolyse kann in diesen Geweben daher der histochemische Nachweis von Sialinsäuren als erbracht gelten.

Nicht verändert durch Einwirkung von Neuraminidase wird die Eisenbindungsreaktion an den Wänden der kapillaren Gänge (Kapillaren und Ausführungsgänge) in den Interstitien zwischen den Azini, nach Säurehydrolyse ist jedoch die Eisenbindungsreaktion negativ, so daß hier die Anwesenheit von neuraminidaseresistenter Sialinsäure angenommen werden kann.

Daß durch Neuraminidase in dem aus der Ratte gewonnenen Geweben überhaupt eine Abschwächung der Eisenbindung erfolgt, ist bemerkenswert. Bislang erwiesen sich die Sialomuzine der Ratte gegenüber der Neuraminidase aus *Vibrio* und *Clostridium* als resistent, mit Ausnahme auf Sialoproteine aus Schilddrüsenkarzinomgewebe (SPICER et al. 1960) und Hypophyse (KLESSEN, 1973) der Ratte.

Es bleibt festzuhalten, daß sich die Eisenbindungsreaktion des Schleimes im Ductus pancreaticus weder nach Inkubation mit Neuraminidase noch durch Behandlung der Schnitte mit Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, oder 0.1 M HCl bei 70°C für eine Stunde abschwächen läßt. Erst eine einstündige Exposition zu 1.0 M HCl bei 70°C vermag die Eisenbindungsreaktion zu vermindern.

Die schwache Eisenbindungsreaktion von Granula im Zymogenbereich der Azinusepithelien ist hingegen sowohl durch Neuraminidase als auch durch Säurebehandlung, pH 2,5 zu beseitigen.

Dadurch ist der Nachweis von Sialinsäure im Bereich der Zymogengranula mit großer Wahrscheinlichkeit erbracht. Für eine Anwesenheit von Sialinsäure im Schleim des Pankreasganges gibt lediglich der Ausfall der PAS-Alcian-Reaktion einen Anhalt.

In der vorliegenden Untersuchung wird der histochemische Nachweis der Sialinsäure auch für das lockere kollagene und für das retikuläre Fett- und Bindegewebe erbracht.

c) Menschliches Pankreas (Kleinkind, Unfalltod)

Durch die PAS-Alcian-Reaktion werden die apikalen Bereiche der Azinusepithelien rotviolett granuliert dargestellt. Die basalen Abschnitte sind PAS-negativ. Das von TURCHINI und KHAU VAN KIEN (1950) mit anderen Methoden wahrscheinlich gemachte Glykogen kann hier nicht nachgewiesen werden.

Die Eisenbindungsreaktion der apikalen Zytoplasmabereiche spricht für die Anwesenheit saurer MPS, die an die Zymogengranula gebunden scheinen.

Stark saure MPS lassen sich im Epithel des Pankreasganges in Form grober Granula und als Schleimschicht auf dem Epithel sowohl durch die PAS-Alcian- als auch durch den Ausfall der Eisenbindungsreaktion nachweisen.

Wie im Pankreasgang der Ratte sind auch hier sowohl Sialomucine wie stark saure, sulfatierte MPS vertreten.

Die sauren MPS im apikalen Zytoplasma der Azinusepithelien zeigen nur in einem Fall eine starke, sonst eine nur geringe Abschwächung der Eisenbindungsreaktion nach Exposition zu pH 2,5.

Erst nach einstündiger Inkubation in 1.0 M HCl bei 70°C ist keine Eisenlagerung an den Azini mehr nachweisbar. Die Schleimsubstanzen der Gänge, die auf pH 2,5 noch volle Eisenbindungsreaktion zeigten, stellen sich schwächer dar.

Wegen dieser Stabilität der Eisenbindungsreaktion gegenüber saurem Milieu ist es zweifelhaft, daß die Eisenanlagerung im Zymogenbereich an Sialinsäuren erfolgt.

Auch die 24-stündige Inkubation mit Neuraminidase führt zu keinem signifikanten Effekt an Azinusepithelien und Gangepithel.

Degegen macht der Ausfall der Eisenbindungsreaktion am interazinären und interlobulären Bindegewebe nach Säurebehandlung und Enzyminkubation - hier allerdings fraglich - die Anwesenheit von Sialinsäure wahrscheinlich.

d) Menschliches Pankreas bei Erythematodes viszeralis, SN 292/74

Wie beim kindlichen Pankreas stellen sich im Bereich der Zymogenzone der Azini saure MPS dar (positive PAS- und Eisenbindungsreaktion). Nach einstündiger Exposition zu Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5, bei 70°C, ist die Eisenbindung im Bereich der Azini unterdrückt, ebenso die Eisenbindung des Bindegewebes.

Die Eisenanlagerung wird in diesem Gewebe also offenbar durch Sialinsäuren bedingt. Bezüglich des Bindegewebes wird dies durch den Ausfall der Eisenbindungsreaktion nach Neuraminidaseinkubation bestätigt, während die Darstellung saurer Gruppen im Zymogenbereich der Azini durch Enzyminkubation nicht beeinflusst wird. Offenbar sind die Sialoproteide - sofern man ihre Gegenwart aus der Säurelabilität der Eisenbindungsreaktion schließen darf - neuraminidase-resistent.

Die erhöhte Säurestabilität der Eisenbindungsreaktion (erst nach Behandlung mit 1.0 M HCl negativ) der Endothelien von Kapillaren und größeren Gefäßen erlaubt einen Rückschluß auf die Anwesenheit von Sialinsäure nur mit Vorbehalt.

Es fällt die große Anzahl von Ausführungsgängen mit starker Schleimbildung auf. Saure MPS lassen sich in hoher Konzentration nachweisen. Die PAS-Alcian-Reaktion und die Eisenbindungsreaktion nach Säurebehandlung entsprechen völlig den bisherigen Ergebnissen, lassen also die gleichen Schlüsse zu.

e) Menschliche Pankreaten bei Mukoviszidose

719/59

Ausgewalzte Azini und Gänge sind von stark sauren Schleimsubstanzen erfüllt.

Die Alcianblau-Reaktion fällt nach Inkubation in saurem Milieu (pH 2,5) nur gering (Azini) bzw. nicht (Gänge) schwächer aus.

Offenbar ist Sialinsäure an der EBR und Alcianblau-Färbung nicht oder fast nicht beteiligt. Dies steht mit den biochemischen Untersuchungen von DISCHE (1960) in Einklang, der den Gehalt des Pankreassaftes an Sialinsäure gegenüber Nichtmukoviszidosekranken erniedrigt fand, allerdings nicht zugunsten anderer saurer Gruppen tragender MPS, sondern zugunsten der neutralen Fucose.

464/58

Bei dieser Form der Mukoviszidose steht nicht die Bildung saurer MPS, sondern eine enorme

Neubildung von Bindegewebe im Vordergrund, das Organ zeigt einen zirrhotischen Umbau.

Vereinzelt lassen sich in den Azini schwach blaue Strukturen, also saure MPS nachweisen. Die in Gang-epithelien liegenden groben Granula zeigen eine starke Eisenanlagerung.

Durch Säurehydrolyse (Natriumazetat/Essigsäure pH 2,5; 0,1 M HCl) läßt sich die Eisenbindungsreaktion dieser sauren MPS nicht bzw. nur gering abschwächen; Sialinsäuren können also zumindest keine maßgebliche Rolle beim Ausfall der Eisenbindungsreaktion spielen.

Das Bindegewebe zeigt nach Säurebehandlung eine deutlich verminderte Eisenbindungsreaktion, kann also als sialinsäurehaltig angesehen werden.

f) intraduktiläre Instillation von Puffer- und Enzymlösung

Ein Vergleich der Folgen von Puffer- und Enzyminstillationen in den Ductus pancreaticus der weißen Ratte zeigt eine erhebliche Abhängigkeit von der verabreichten Flüssigkeitsmenge, nicht von deren Qualität. Ab 0,5 - 0,8 ml instillierter Flüssigkeit sind stets ein schweres Ödem des Pankreas und lobuluszentrale Nekrosen zu beobachten.

Allenfalls läßt sich im histologischen Bild der durch Instillation einer Neuraminidase-Lösung erzeugten Pankreatitis eine starke Reaktion der segmentkernigen Leukozyten beobachten. Eventuell läßt sich dies als Folge einer Abspaltung von Sialinsäure werten. A. LEE (1968) beschreibt für Erythrozyten eine Schutzwirkung der in der Zellmembran roter Blutkörperchen enthaltenen Sialinsäure vor Phagozytose durch Makrophagen.

Die starke Eisenbindungsreaktion der Mukopolysaccharide des Ductus pancreaticus wird durch die Instillation nicht beeinträchtigt, auch nicht, wenn eine schwere Pankreatitis entstanden ist.

Die Ursache der nekrotisierenden Pankreatitis ist mit großer Wahrscheinlichkeit in einer Traumatisierung der kleinsten Ausführungsgänge, an denen sich der größte Druckabfall zur Peripherie hin manifestiert, sowie der gangnahen Azini zu suchen.

Durch Instillation größerer Mengen als 0,5 ml wird offenbar die mechanische Widerstandsfähigkeit der kleinen Gänge überschritten - sie rupturieren.

Die Schleimschicht des Pankreasganges läßt sich durch Instillation von Neuraminidase nicht zerstören - zumindest nicht in der hier applizierten Konzentration -.

Die schon seit langem (FLEXNER, 1906) vermutete Schutzfunktion der Schleimschichten in den Pankreasgängen wird immer wieder bestätigt. H. BADE (1972) berichtet über eine langandauernde Resistenz des Schleimes aus Pankreasgängen von Rinder- und Schweinepankreaten gegenüber Detergentien und Natrium-Taurocholat. Als Parameter der Resistenz diente die Anfärbarkeit des Schleimes durch Eisenbindungsreaktion (Modifikation von MÜLLER, 1955) und die PAS-Alcian-Reaktion. Diese Resistenz beruht offenbar nicht auf dem Gehalt von Sialinsäuren.

HOSKINS et al. (1963) konnten keinen Effekt der Sialinsäure bei der Verdauung der Schleimstoffe des Magensaftes durch Trypsin, Chymotrypsin oder Endopeptidasen des Pankreas feststellen.

In der vorliegenden Untersuchung fand sich ein völlig übereinstimmendes Verhalten der Schleime von Pankreasgang, Becherzellen und des Schleimes der oberflächlichen Anteile der Drüsenläuche des Magens. Es ist daher naheliegend, die Aussagen von HOSKINS (1963) über MPS des Magens auf die des Pankreas zu übertragen.

VI. Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wurden die sauren Mukopolysaccharide des Pankreas der weißen Ratte mit denen aus Duodenum und Magen verglichen und ein histochemischer Nachweis von Sialomucinen versucht.

Es fand sich ein übereinstimmendes Verhalten der Schleime aus Pankreasgang, Becherzellen des Duodenum und oberflächlichen Anteilen der Drüsenläuche der Magenschleimhaut, in denen eine gewisse Menge an Sialomucin wahrscheinlich gemacht werden konnte.

Der größte Teil der sauren Mukopolysaccharide besteht jedoch aus sulfatierten Schleimen.

Offensichtlich sialinsäurehaltig sind die Zymogengranula der Azinusepithelien.

Auch in menschlichen Pankreaten lassen sich Sialomuzine im Schleim des Pankreasganges neben anderen sauren MPS nachweisen. Bei einem Fall von Lupus Erythematodes viszeralis erscheint der Schleimgehalt des Gangepithels besonders hoch.

In Pankreaten bei Mukoviszidose fanden sich saure MPS, in einem Fall extrem große Mengen, in denen offenbar nur wenig Sialinsäure enthalten ist.

Versuche, durch Instillation von Neuraminidase in den Ductus pancreaticus der weißen Ratte eine Pankreatitis auszulösen, erbrachten keine signifikanten Unterschiede zu den Folgen einer Instillation gleicher Puffer-volumina.

VII.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) AMINOFF, D.: Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids
Biochem. J. 81, 384 (1961)
- 2) ARNOLD, M.: Histochemie
Springer-Verlag Berlin*Heidelberg-New York 1968
- 3) ARNOLD, M.: Die Verwendbarkeit von Metallsolen zum elektronenmikroskopischen Nachweis von sauren Mukopolysacchariden
Acta histochem. (Jena) Suppl.X, 149-163 (1971)
- 4) BADE, H.: Zur Auflösbarkeit des intrazellulären Schleims in den Ausführungsgängen des Pankreas
Inaugural-Dissertation, Fachbereich Medizin der Freien Universität Berlin (1972)
- 5) BARGMANN, W.: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 6. Auflage (1967)
S. 463
- 6) BLIX, G.: Über die Kohlenhydratgruppen des Submaxillaris Mucins
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 240, 43-54 (1936)
- 7) BLIX, G., A. GOTTSCHALK, E. KLENK: zit. nach A. GOTTSCHALK: Sialic acids: Their molecular structure and characteristic reactions
Arzneimittelforschung 10, 355-357 (1960)
- 8) BÖHM, P.: Die Neuraminsäure (Biochemie, Biologie und Klinik)
I. Mitteilung
Dtsch. Zeitschr. f. Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten Bd. 19 Heft 3 66-87 (1959)
- 9) BÖHM, P.: Die Neuraminsäure (Biochemie, Biologie und Klinik)
II. Mitteilung
Dtsch. Zeitschr. f. Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten Bd. 19 Heft 3 129-141 (1959a)
- 10) CARLBORG, L., S. DAHLGREN, B. NORDGREN: Gastric secretion of hydrochloric acid and sialic acid in patients with peptic ulcer and gastric cancer during intravenous infusion of histamine
Scan. J. Gastroent. 5, 427-431 (1970)
- 11) CASTELLANI, A.A., G. FERRI, L. BOLOGNANI, V. GRAZIANO: Presence of sialic acid in connective tissues
Nature (London) 186, 949-951 (1960a)

- 12) COMB, D.G., S. ROSEMAN: zit. nach A. GOTTSCHALK: Correlation between composition, structure, shape and function of a salivary mucoprotein
Nature (London) 186, 949-951 (1960a)
- 13) CORNFORTH, J.W., M.E. DAINES, A. GOTTSCHALK: zit. nach R. SCHAUER: Chemie und Biologie der Acylneuraminsäuren
Angew. Chemie 3, 128-140 (1973)
- 14) COOPER, D.J.: Mucin histochemistry of mucous carcinomas of breast and colon and non-neoplastic breast epithelium
J. clin. Path. 27, 311-314 (1974)
- 15) DAVIES, D.V.: Specificity of staining methods for mucopolysaccharides of the hyaluronic acid type
Stain Technol. Vol. 27, No. 2, 65-70 (1952)
- 16) DIEZEL, P.B.: Die Stoffwechselstörungen der Sphingolipide
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1957)
S. 17
- 17) DISCHE, Z.: Fucose and sialic acid in glycoproteins of the mucus of the digestive tract
Fed. Proc. 19, 904-910 (1960)
- 18) DOMSCHKE, W., S. DOMSCHKE, M. CLASSEN, L. DEMLING: Some properties of mucus in patients with gastric ulcer. Effect of treatment with carbenoxolone Sodium
Scand. J. Gastroent. 7, 647-651 (1972)
- 19) ELFTMAN, H.: A chrome-alum fixative for the pituitary
Stain Technol. 32, 25-28 (1957)
- 20) FAILLARD, H.: zit. nach R. SCHAUER: Chemie und Biologie der Acylneuraminsäuren
Angew. Chemie 3, 128-140 (1973)
- 21) FLEXNER, S.: The constituent of bile causing pancreatitis and the effects of colloids on its action
J. exp. Med. 8, 167 (1906)
- 22) GASIC, G., L. BERWICK: Hale stain for sialic containing mucins.
J. Cell. Biol. 19, 223-228 (1963)
- 23) GEYER, G., W. LINSS, P. SCHAAF, I. MÖLLER, A. MÜLLER: Ultrahistochemische Untersuchungen an isolierten glomerulären Basalmembranen
Acta histochem. (Jena) 35, 67-74 (1970)
- 24) GIBBONS, R.A.: The sensitivity of the neuraminosidic linkage in mucosubstances towards acid and towards neuraminidase
Biochem. J. 89, 380-391 (1963)

- 25) GLASS, G.B.J., M. RICH, L. STEPHANSON: Comparative study of mucoproteins of human gastric juice and serum
Gastroenterology 34, 598 (1958)
- 26) GLICK, M.C., C.A. COMSTOCK, M.A. COHEN, L. WARREN: Membranes of animal cells. VIII. Distribution of sialic acid, hexosamines and sialidase in the L cell
Biochem. Biophys. Acta 233, 247-257 (1971)
- 27) GOMORI, G.: The histochemistry of mucopolysaccharides
Brit. J. Exp. Path. 35, 377 (1954)
- 28) GOTTSCHALK, A., P.E. LIND: zit. nach A. GOTTSCHALK: Sialic acids: Their molecular structure and characteristic reactions. *Arzneimittelforschung* 10, 355-357 (1960)
- 29) GOTTSCHALK, A.: Sialic acids: Their molecular structure and characteristic reactions
Arzneimittelforschung 10, 355-357 (1960)
- 30) GOTTSCHALK, A.: Correlation between composition, structure, shape and function of a salivary mucoprotein
Nature (London) 949-951 (1960)
- 31) GOTTSCHALK, A. (*Nature* 1951, *Nature* 1955, *Biochem. J.* 1955): zit. nach A. GOTTSCHALK: Sialic acids: Their molecular structure characteristic reactions
Arzneimittelforschung 10, 355-357 (1960)
- 32) GOTTSCHALK, A., R. DRZENIEK: Neuraminidase as a tool in structural analysis
aus A. GOTTSCHALK: *Glycoproteins*
BBA Library, vol. 5, part. A, sec. ed., 381-402
Amsterdam-London-New York: Elsevier Publishing Co. (1972)
- 33) GRAUMANN, W.: Vergleichende Untersuchungen zur Frage der Spezifität verschiedener Modifikationen der Polysaccharid-Eisenreaktion
Acta histochem (Jena) 5, 49-61 (1958)
- 34) GRAUMANN, W., W. CLAUS: Weitere Untersuchungen zur Spezifität der histochemischen Polysaccharid-Eisenreaktion
Acta histochem. (Jena) 6, 1-7 (1958)
- 35) GRAUMANN, W.: Handbuch der Histochemie
II/2 Polysaccharide
G. Fischer Verlag Stuttgart 1964
- 36) HALE, C.W.: Histochemical demonstration of acid polysaccharides in animal tissues
Nature (London) 157, 157-802 (1946)

- 37) HEINKEL, K.: Die Ratte als Versuchstier in der experimentellen Pankreasdiagnostik. II. Mitteilung. Die Erzeugung einer akuten hämorrhagischen Pankreatitis durch Injektion von Gallensäure in den Ductus pancreaticus Klin. Wochenschr. 31, 815 (1953)
- 38) HOSKINS, L.C., N. ZAMCHECK: Studies on the "mucous barrier": Evaluation of sialic acid as a protective factor against degradation of gastric mucus by pancreatic endopeptidase Gastroenterology 44, 456-462 (1963)
- 39) IMMERS, J.: Chemical and histochemical demonstration of acid esters by acetic iron reagent Exper. Cell. Res. 6, 127-133 (1954)
- 40) JENNINGS, M.A., H.W. FLOREY: Autoradiographic observations on the mucous cells of the stomach and intestine Quatr. J. Exp. Physiol. 41, 131 (1956)
- 41) KLENK, E. (Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 1941): zit. nach R.SCHAUER: Chemie und Biologie der Acylneuraminsäuren Angew. Chemie 3, 128-140 (1973)
- 42) KLESSEN, C.: Zum Nachweis von Sialinsäure enthaltenden Glykoproteinen in den Mucoidzellen der Adenohypophyse der Ratte Histochemie 35, 297-306 (1973)
- 43) KEMP, R.B.: Studies on the role of cell surface sialic acids in intercellular adhesion Folia histochem. cytochem. 9, 25-30 (1971)
- 44) LEE, A. (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1968): zit. nach R. SCHAUER: Chemie und Biologie der Acylneuraminsäuren Angew. Chemie 3, 128-140 (1973)
- 45) LETTERER, E.: Über die epitheliale und mesodermale Schleimbildung in ihrer Beziehung zur schleimigen Metamorphose und schleimigen Degeneration Verlag von S. Hirzel in Leipzig 1932
- 46) LILLIE, R.D.: Studies on the preservation and histological demonstration of glycogen Bull. int. Ass. med. Mus. 27, 23 (1947)
- 47) LISON, L. (Histochemie et Cytochimie Animales, 1953): zit. nach G. MÜLLER: Über eine Vereinfachung der Reaktion nach Hale (1946) Acta histochem. (Jena) 2, 68-70 (1955)
- 48) Mc MANUS, J.F.A.: Histochemical demonstration of mucin after periodic acid Nature (London) 158, 202 (1946)

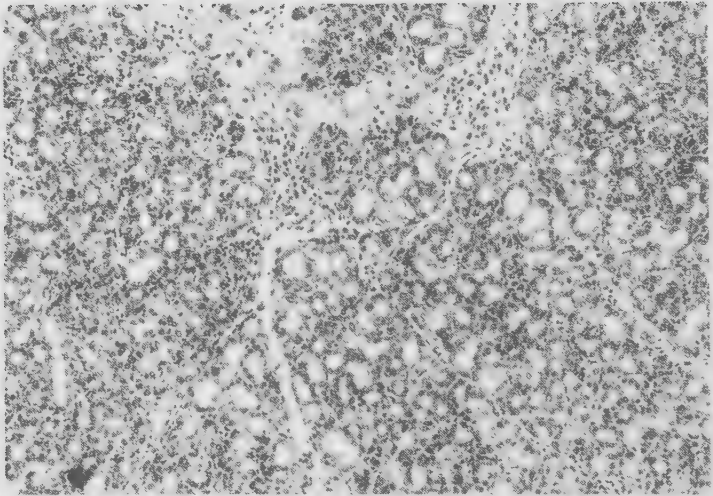
- 49) MEYER, K. (1955): zit. nach W. GRAUMANN: Handbuch der Histochemie
II/2 Polysaccharide
G. Fischer Verlag Stuttgart, S. 42 (1964)
- 50) MOWRY, R.W.: Alcian blue techniques for the histochemical
study of carbohydrates
J. Histochem. Cytochem. 4, 407 (1956)
- 51) MOWRY, R.W., C.H. WINKLER:
The coloration of acidic carbohydrates of bacteria
and fungi in tissue sections with special reference
to capsules of *Cryptococcus neoformans*, *Pneumococci*
and *Staphylococci*
Amer. J. Path. 32, 628-629 (1956)
- 52) MÜLLER, G.: Über eine Vereinfachung der Reaktion nach HALE (1946)
Acta histochem. (Jena) 2, 68-70 (1955)
- 53) PEARSE, E.A.G.: Histochemistry. Theoretical and Applied
Churchill Ltd. London 1953
- 54) PUSZTAI, A., W.T.J. MORGAN:
Studies in immunochemistry.
18. The isolation and properties of a sialomuco-
polysaccharide possessing blood-group Le^a specificity
and virus-receptor activity
Biochem. J. 78, 135-146 (1961)
- 55) QUINTARELLI, G.: Histochemistry of sialo-mucins in connectiv
tissues
Histochemie 2, 356-358 (1961)
- 56) QUINTARELLI, G., S. TSUIKI, Y. HASHIMOTO, W. FIGMAN: Studies of
sialic acid-containing mucins in bovine sub-
maxillary and rat sublingual glands
J. Histochem. Cytochem. 9, 176-183 (1961)
- 57) RAPOPORT, S.M.: Medizinische Biochemie
VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin 1969, S. 698
- 58) RAVETTO, C.: Histochemical identification of sialic (neuraminic)
acids
J. Histochem. Cytochem 12, 306 (1964)
- 59) RAVETTO, C.: Histochemical identification of N-acetyl-O-Dia-
cetylneuraminic acid resistant to neuraminidase
J. Histochem. Cytochem. 16, 663 (1968)
- 60) RINEHART, J.F., S.K. ABUL-HAJ: An improved method for histologic
demonstration of acid mucopolysaccharides in tissues
A.M.A. Arch. Path. 52, 189-194 (1951)
- 61) ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik
Verlag Urban und Schwarzenberg München, 15. Aufl. 1948

- 62) SCHAUER, R.: Chemie und Biologie der Acylneuraminsäuren
Angew. Chemie 3, 128-140 (1973)
- 63) SCHEINTHAL, B.M., F.A. BETTELHEIM (Carbohyd. Res., 1968): zit.
nach R. SCHAUER: Chemie und Biologie der Acyl-
neuraminsäuren
Angew. Chemie 3, 128-140 (1973)
- 64) SCHMITZ-MOORMANN, P.: Zur Histochemie der Neuraminsäure
Histochemie 20, 78-86 (1969)
- 65) SHEAR, M., A.G.E. PEARSE: A direct histochemical method for the
demonstration of sialic acid
Nature (London) 195, 1273-1275 (1963)
- 66) SPICER, S.S.: A correlative study of the histochemical
properties of rodent acid mucopolysaccharides
J. Histochem. Cytochem. 8, 18 (1960)
- 67) SPICER, S.S., L. WARREN: The histochemistry of sialic acid con-
taining mucoproteins
J. Histochem. Cytochem. 8, 135-137 (1960)
- 68) SPICER, S.S., S.H. WOLLMAN, L. WARREN: Histochemical demonstration
of sialomucin in transplantable thyroid carcinoma
Amer. J. Path. 37, 599-609 (1960)
- 69) SPIRO, R.G.: Studies on fetuin, a glycoprotein of fetal serum.
II. Nature of the carbohydrate units
J. Biol. Chem. 237, 382 (1962)
- 70) SPRINGER (1954, 1955): zit. n. W. GRAUMANN: Handbuch der Histochemie
II/2 Polysaccharide
G. Fischer Verlag Stuttgart 1964, S. 51
- 71) STEEDMAN, F.H.: Alcian blue 8 GS: A new stain for mucin
Quart. J. Micr. Sci. 91, 477 (1950)
- 72) SVENNERHOLM, L. (1956, 1957): zit. nach R. SCHAUER: Chemie und
Biologie der Acylneuraminsäuren
Angew. Chemie 3, 128-140 (1973)
- 73) TURCHINI und KHAU VON KIEN (1950): zit. nach W. GRAUMANN:
Handbuch der Histochemie
II/2 Polysaccharide
G. Fischer Verlag Stuttgart 1964, S. 336
- 74) WANKE, M.: Experimentelle Pankreatitis
Zwanglose Abhandlungen aus dem Gebiet der normalen
und pathologischen Anatomie, Heft 19
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1968

- 75) WARREN, L. S.S. SPICER: Biochemical and histochemical identification of sialic acid containing mucins of rodent vagina and salivary glands
J. Histochem. Cytochem. 9, 400-408 (1961)
- 76) WEISS, L.: Sialic acid as a structural component of some mammalian tissue cell surfaces
Nature (London) 191, 1108-1109 (1961)
- 77) WERNER, I.: Studies on glycoproteins from mucous epithelium and epithelial secretions.
Acta Soc. Med. upsaliens 58, 1-55 (1953)
- 78) ZUGIBE, F.T., C. PEPINE, P. BELL jun., J. MUST: Shear and Pearse method for direct histochemical Demonstration of sialic acid
Nature (London) 201, 630-631 (1964)

VIII. A B B I L D U N G E N

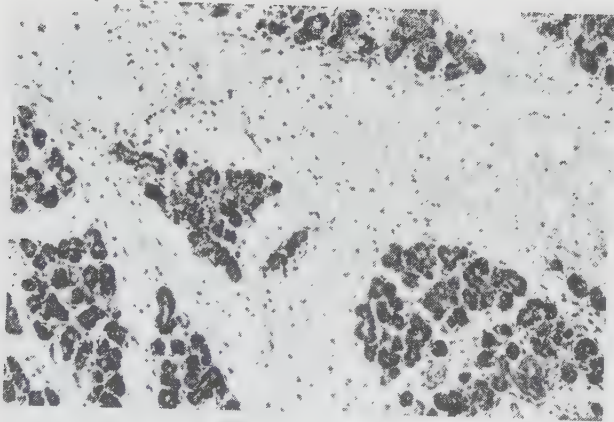
Abbildung 1



Pankreas der Ratte 48 Stunden nach Gangligatur - HE-Färbung-
Vergrößerung 160 x.

Stark ausgeweitete Azini mit abgeplatteten, ausgewalzten Epi-
thelien. Gänge erweitert mit abgeflachtem Epithel, starke
Bindegewebsneubildung. Kein Anhalt für Entzündung oder Nekrose!

Abbildung 2

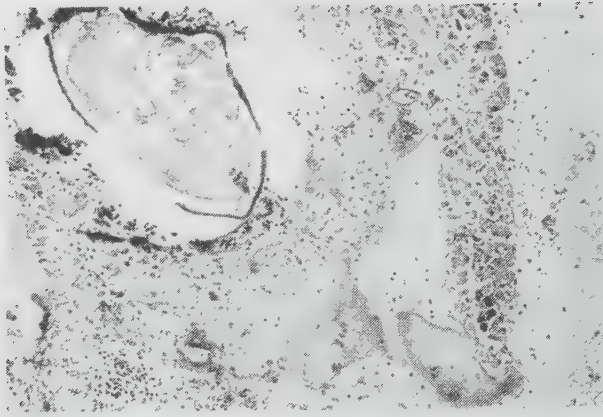


Pankreas der Ratte 48 Stunden nach Instillation von 0,8 ml
einer Neuraminidase-Lösung, entsprechend $0,10^4$ U Enzym -
HE-Färbung -

Vergrößerung 160 x.

Pankreas durch große Ödemseen aufgesplittert, Azini erweitert,
teils in einzelne Epithelzellen aufgelöst. Gänge erweitert.
In Ödemseen Rundzellen und Fibroblaten.

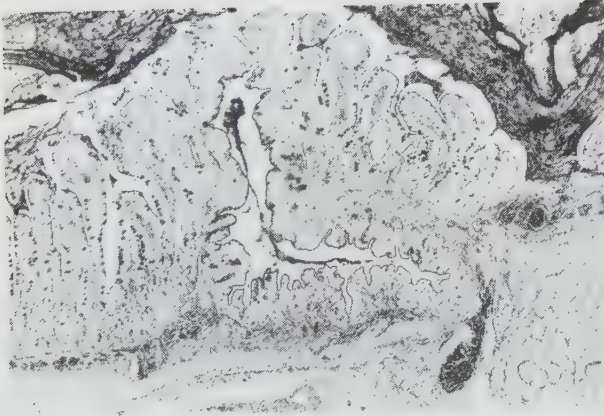
Abbildung 3



Pankreas der Ratte 24 Stunden nach Instillation von 1,4 ml Natriumazetatpuffer, pH 5,0 - HE-Färbung - Vergrößerung 160 x.

Schwere, nekrotisierende Pankreatitis! Im Bild findet sich links oben ein stark ausgeweiteter, zerstörter Pankreasgang mit abgelöster Epithelschicht, Einzelepithelien nekrotisch und verklumpt. Riesige Ödemseen, Fettgewebsnekrosen (rechter Bildrand)

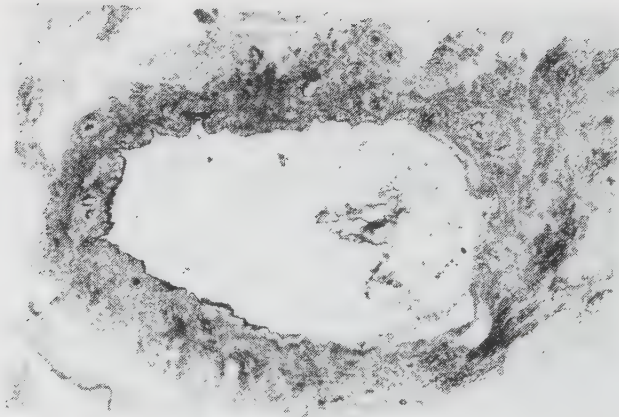
Abbildung 4



Pankreas der Ratte 24 Stunden nach Instillation von 0,8 ml Neuraminidase-Lösung, entsprechend 0,16 U Enzym, und nachfolgender Gangligatur. Inkubation des Schnittes für 1 Stunde bei 70°C in 1,0 M HCl - Eisenbindungsreaktion nach GRAUMANN und CLAUSS (1958) - Vergrößerung 100 x.

Gezeigt wird die Einmündung des Ductus pancreaticus in das Duodenum (Papille). Starke Eisenanlagerung an den freien Saum des Epithels, an Schleim der Becherzellen sowie an fädige Massen im Lumen des Duodenum. Keine Eisenanlagerung an das Bindegewebe.

Abbildung 5



Pankreas der Ratte 24 Stunden nach Instillation von 0,8 ml Neuraminidase-Lösung, entsprechend 0,16 U Enzym, mit nachfolgender Gangligatur. Eisenbindungsreaktion nach GRAUMANN und CLAUSS (1958) - zuvor Inkubation des Schnittes für 1 Stunde bei 70°C in Natriumazetatpuffer, pH 5,0. - Vergrößerung 60 x.

Mäßig ausgeweiteter Ductus pancreaticus. Beachte die kräftige Eisenanlagerung am freien Rand der Gangepithelien und am kollagenen Bindegewebe, welches den Gang umgibt. Epithelablösung links oben im Bild wahrscheinlich mechanisch bedingt.

Abbildung 6

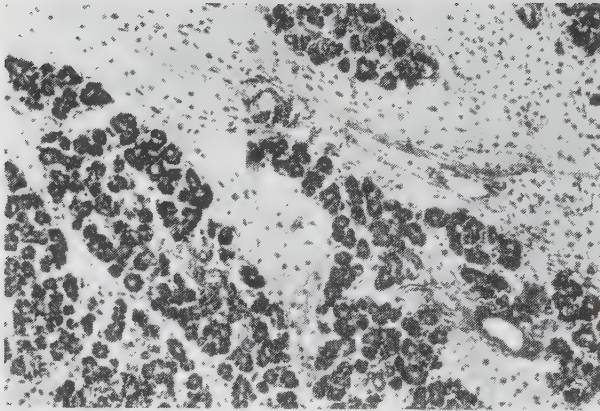


Pankreas der Ratte 24 Stunden nach Instillation von 0,8 ml Neuraminidase-Lösung, entsprechend 0,16 U Enzym, mit nachfolgender Gangligatur. Inkubation des Schnittes für 1 Stunde bei 70°C in Natriumazetat/Essigsäure, pH 2,5 - Eisenbindungsreaktion nach GRAUMANN und CLAUSS (1958).

Vergrößerung 60 x.

Nach wie vor kräftige Eisenbindung am freien Rand der Gang-epithelien. Dagegen keine Eisenanlagerung an das kollagene Bindegewebe um den Gang.

Abbildung 7

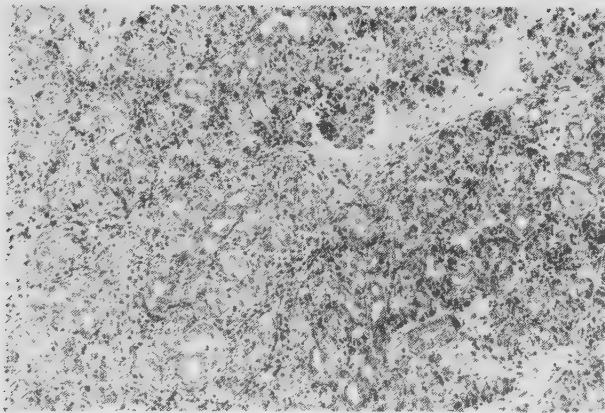


Pankreas der Ratte 72 Stunden nach Instillation von 0,8 ml
Neuraminidase-Lösung, entsprechend 0,104 U Enzym - HE-Färbung -.
Vergrößerung 160 x.

Rückgang des Ödems gegenüber dem Bild 48 Stunden nach Enzym-
Instillation.

Ansonsten gleicher Befund.

Abbildung 8



Pankreas der Ratte 72 Stunden nach Instillation von 0,8 ml
Neuraminidase-Lösung, entsprechend 0,104 U Enzym - HE-Färbung -.
Vergrößerung 160 x .

In einigen Pankreasbezirken finden sich Zeichen von Obstruktion
der Ausführungsgänge: ausgewalzte, erweiterte Azini, Bindege-
websvermehrung.

Einzelne Azini atrophieren.

Herrn Professor Dr. med. V. Becker möchte
ich für die Überlassung des Themas und
seine stete Unterstützung aufrichtig danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Ehefrau Irene für ihre Assistenz bei den tierexperimentellen Operationen und ihre stete Geduld während der Abfassung der Arbeit.

Herrn Dr. med. G. Bergen danke ich für seine Hilfe bei den operativen Tierversuchen.

Eine unentbehrliche Hilfe beim Schreiben der Arbeit leistete Frau K. Späth, wofür ich mich an dieser Stelle noch einmal herzlich bedanken möchte.

Lebenslauf

Am 5. Juni 1948 wurde ich als Sohn des damaligen Regierungsrates Albrecht-Otto Fülle und seiner Ehefrau Eugenie Fülle, geborene Knödler, in Stuttgart geboren.

Nach Übersiedelung der Familie nach Düsseldorf besuchte ich dort von Ostern 1955 bis Ostern 1959 die Volksschule und von Ostern 1959 bis Ostern 1964 das Rethel-Gymnasium.

1964 zog die Familie nach Frankfurt am Main um, ich wechselte daher an Ostern 1964 auf die Ziehenschule in Frankfurt am Main über, an deren mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig ich am 14. Juni 1967 das Zeugnis der Reife erhielt.

Im Wintersemester 1967 begann ich an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main das Medizinstudium, im Oktober 1968 legte ich dort die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab.

Ab Sommersemester 1969 setzte ich das Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen fort, wo ich im April 1970 das Physikum bestand. Im März 1974 absolvierte ich in Erlangen das medizinische Staatsexamen mit sehr gutem Erfolg.

Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich von Juli 1974 bis Ende Juni 1975 am Kreiskrankenhaus Obergünzburg ab, wo ich nach Erhalt der Approbation im Juli 1975 als Assistenzarzt an der chirurgischen Abteilung weiter beschäftigt war.

Im August 1975 verheiratete ich mich mit meiner Ehefrau Irene Fülle, geborene Kaufmann.

Im September 1975 wurde ich zur Bundeswehr einberufen, bei der ich derzeit meiner Wehrpflicht als Stabsarzt genüge.

Erlangen, im Mai 1976

Peter Fülle

(Peter Albrecht Fülle)

Copy - Center 2000
852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197